

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Snežana S. Brkić

Učestalost i molekularna karakterizacija  
karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata  
enterobakterija u Beogradu

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Snežana S. Brkić

Prevalence and molecular characterization of  
carbapenemase-producing enterobacteria  
community isolates in Belgrade

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Mentor:**

prof. dr Ivana Ćirković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**Članovi komisije:**

prof. dr Slobodanka Đukić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

prof. dr Goran Stevanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

prof. dr Nataša Maksimović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

prof. dr Dragana Božić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

doc. dr Deana Medić, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

**Datum odbrane doktorske disertacije:** \_\_\_\_\_

## **ZAHVALNICA**

*Velika je sreća imati velike ljude kraj sebe u izazovnim vremenima.  
Za one koji su svojim delima, punog srca uz vas, teško je naći prave reči zahvalnosti.*

*HVALA svima koji su me podržali u ovom radu, a posebno:*

*Mom mentoru, profesorki dr Ivani Ćirković, na podršci, poverenju, uloženom trudu, idejama i  
pre svega prijateljskom odnosu koji motiviše i inspiriše  
i u najizazovnijim trenucima naučnog rada.*

*Članovima komisije, na uloženom vremenu, sugestijama i pomoći  
da ova disertacija dobije svoj konačni oblik.*

*Dragim kolegama iz Zavoda Konzilijum i Gradskog zavoda za javno zdravlje u Beogradu  
na podršci i saradnji u toku realizacije ovog rada.*

*Mojim roditeljima, na ljubavi, podršci, vaspitanju i primeru  
kako biti čovek.*

*Mom Nebojši, na bezgraničnoj ljubavi i pažnji koji su me ispunjavali  
i u najlepšim i u najtežim trenucima.*

*Mojoj deci, Đorđu i Aleksandru, najvećoj sreći i smislu života,  
kojima posvećujem ovaj rad!*

## Učestalost i molekularna karakterizacija karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija u Beogradu

**UVOD:** Antimikrobna rezistencija predstavlja aktuelni, globalni javnozdravstveni problem, posebno kod enterobakterija. Najvažniji mehanizam rezistencije je produkcija karbapenemaza. Geni za ove enzime se kod karbapenemaza-produkujućih enterobakterija (CPE) nalaze uglavnom na plazmidima, i imaju izuzetan potencijal horizontalnog i vertikalnog transfera, što značajno doprinosi širenju antimikrobne rezistencije. Bolnička sredina se smatra glavnim rezervoarom rezistentnih bakterija, dok su podaci o stečenoj rezistenciji kod vanbolničkih izolata uglavnom nepoznati, iako se najveća potrošnja antibiotika registruje u primarnoj zdravstvenoj zaštiti.

**CILJEVI:** Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalost, tipove karbapenemaza, kao i klonalnu povezanost i klonalnu distribuciju CPE izolata kod vanbolničkih pacijenata; ispitati osetljivost na antibiotike i mehanizme rezistencije na kolistin, kao rezervnog antibiotika u lečenju infekcija izazvanih CPE; proceniti, na osnovu dobijenih rezultata, potrebu za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem CPE u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda.

**MATERIJAL I METODE:** Od 44.686 ispitanih vanbolničkih izolata enterobakterija, u studiju je uključeno 179 izolata sa pozitivnim skriningom na produkciju karbapenemaza. Identifikacija do nivoa vrste rađena je MALDI-TOF MS metodom. *Multiplex* PCR je korišćen za detekciju gena za karbapenemaze:  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{OXA-48-like}$ ,  $bla_{VIM}$  i  $bla_{IMP}$ . Molekularna tipizacija CPE izolata rađena je metodom ERIC-PCR. Osetljivost na antibiotike određena je disk difuzijom, u automatizovanom sistemu i bujon mikrodilucionom metodom. Za kolistin-rezistentne CPE izolate utvrđivani su mehanizmi rezistencije na kolistin MALDI-TOF MS analizom lipida A i sekvenciranjem celog genoma (WGS). Rezultati dobijeni WGS analizom korišćeni su za *in silico* MLST tipizaciju kolistin-rezistentnih CPE i karakterizaciju plazmida nosioca gena za karbapenemaze.

**REZULTATI:** Geni za karbapenemaze su dokazani kod 144/179 izolata enterobakterija sa pozitivnim skriningom na karbapenemaze. Utvrđena učestalost CPE u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda je 0,34% (95% CI 0,3-0,4%). Najčešće vrste CPE bile su *Klebsiella pneumoniae* (79%) i *Enterobacter cloacae/asburiae* (14%). Najčešća karbapenemaza je OXA-48-like (64,6%), slede NDM (20,8%), KPC (6,9%) i VIM (2,1%). Kod 5,6% izolata CPE dokazana su po dva različita gena:  $bla_{OXA-48-like}$  i  $bla_{NDM}$  kod *K. pneumoniae*, *E. cloacae/asburiae* i *Escherichia coli*,  $bla_{OXA-48-like}$  i  $bla_{KPC}$  kod *K. pneumoniae* i  $bla_{KPC}$  i  $bla_{NDM}$  kod *K. pneumoniae*. ERIC-PCR analiza utvrdila je klonalnu povezanost između izolata *K. pneumoniae*, kao i između izolata *E. cloacae/asburiae*. Od 26 klastera *K. pneumoniae*, najzastupljeniji su bili klasteri 7 i 11 (po 12,5%). U klasteru 7 grupisani su svi izolati sa  $bla_{KPC}$  genom. Za osam klastera (2, 6, 11, 13, 14, 17, 18, 22) pokazana je statistički značajna povezanost sa  $bla_{OXA-48-like}$  genom ( $p < 0,05$ ). Od šest klastera *E. cloacae/asburiae*, najveću učestalost imali su klasteri 5 (29,4%) i 6 (35,3%), za koje je pokazana statistički značajna udruženost sa  $bla_{NDM}$  genom ( $p < 0,05$ ). Dodatno, klaster 6 je pokazao povezanost sa  $bla_{NDM}$  i  $bla_{OXA-48-like}$  ( $p < 0,05$ ). Svi izolati imali su MDR profil, odnosno rezistenciju na bar jedan antibiotik iz tri ili više različitih kategorija. Rezistencija na kolistin utvrđena je kod 23,4% CPE, isključivo kod izolata *K. pneumoniae*. WGS analizom je kao dominantni mehanizam rezistencije na kolistin utvrđena supstitucija  $MgrB^{C28S}$  na hromozomskom *mgrB* genu, prvi put opisana u ovoj studiji. Geni *mcr* 1-5, kao markeri rezistencije na kolistin posredovane plazmidom, nisu nađeni. MALDI-TOF MS analiza pokazala je dodatni pik (1971 m/z) u masenom spektru lipida A, koji odgovara modifikaciji posredovanoj mutacijama hromozomskog *pmrHFIIJLM* operona. MLST je 94% kolistin-

rezistentnih vanbolničkih CPE svrstao u visoko rizični klon ST101, kome pripadaju bolnički izolati iz Srbije, Slovenije, Turske i Grčke. Svi karbapenemaza-produkujući ST101 izolati imali su *bla<sub>OXA-48</sub>* gen. Kao nosilac *bla<sub>OXA-48</sub>* gena utvrđen je novi, hibridni plazmid pSRB\_OXA-48, prvi put detektovan kod izolata iz ove studije.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ovog istraživanja pokazali su da vanbolnička populacija predstavlja značajan rezervoar enterobakterija rezistentnih na karbapeneme i kolistin. Pokazana je klonalna povezanost i distribucija vanbolničkih izolata, stoga se, radi kontrole širenja rezistencije i sprečavanja pojave epidemija, preporučuje laboratorijska detekcija i praćenje CPE u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda.

**Ključne reči:** karbapenemaza-produkujuće enterobakterije, OXA-48, kolistin, ST101, vanbolnički, rezistencija.

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Mikrobi i infekcija

**UDK broj:**

## Prevalence and molecular characterization of carbapenemase-producing enterobacteria community isolates in Belgrade

**INTRODUCTION:** Antimicrobial resistance is an emerging, global public health problem, especially in enterobacteria. The most important mechanism is production of carbapenemases. Carbapenemase genes are mostly located on plasmids of Carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE), and have great potential of horizontal and vertical transfer, which significantly contributes to the spread of antimicrobial resistance. Health-care settings are the major reservoir of resistant bacteria, but the data on antimicrobial resistance in community bacterial isolates remains unknown, despite the fact that the vast majority of the antibiotics have been prescribed in the primary health-care settings.

**AIMS:** The aims of this study were to determine prevalence, types of carbapenemases, clonal relatedness and clonal distribution of community CPE isolates; to examine antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to colistin, as a reserve antibiotic in the treatment of CPE infections; to estimate the need for laboratory detection and surveillance of community CPE isolates in Belgrade.

**MATERIALS AND METHODS:** Among 44.686 community isolates of enterobacteria, 179 were positive on carbapenemase screening test, and included in the further study. Identification of isolates was performed by MALDI-TOF MS. Carbapenemase genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> were detected with *multiplex* PCR. Molecular typing of CPE was performed by ERIC-PCR. Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion, automated system and broth microdilution. For colistin-resistant CPE, mechanisms of colistin resistance were examined by MALDI-TOF MS analysis of Lipid A and Whole Genome Sequencing (WGS). WGS data was used for *in silico* MLST analysis and characterization of carbapenemase genes genomic background on plasmid.

**RESULTS:** Carbapenemase genes were detected in 144/179 isolates of enterobacteria with positive screening for carbapenemases. The prevalence of CPE community isolates in Belgrade was 0,34% (95% CI 0.3-0.4%). The most common CPE species were *Klebsiella pneumoniae* (79%) and *Enterobacter cloacae/asburiae* (14%). The most common carbapenemase was OXA-48-like (64,6%), followed by NDM (20,8%), KPC (6,9%) and VIM (2,1%). Two carbapenemase genes were detected in 5,6% of CPE isolates: *bla*<sub>OXA-48-like</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> in *K. pneumoniae*, *E. cloacae/asburiae* and *Escherchia coli*, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> in *K. pneumoniae* and *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> in *K. pneumoniae*. ERIC-PCR have showed clonal relatedness of *K. pneumoniae* isolates, as well as *E. cloacae/asburiae* isolates. Among 26 clusters of *K. pneumoniae*, the most prevalent were clusters 7 and 11 (12,5% each). All *bla*<sub>KPC</sub> positive isolates belonged to cluster 7. For eight clusters (2, 6, 11, 13, 14, 17, 18 and 22) statistically significant correlation with *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gene ( $p < 0,05$ ) have shown. Among six clusters of *E. cloacae/asburiae*, the most prevalent were clusters 5 (29,4%) and 6 (35,3%). They have showed statistically significant correlation with *bla*<sub>NDM</sub> gene ( $p < 0,05$ ). Additionally, cluster 6 was correlated with both *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA-48-like</sub> ( $p < 0,05$ ). All isolates were MDR, as they showed resistance to at least one agent in three or more antimicrobial categories. Colistin resistance was detected in 23,4% of CPE, exclusively in *K. pneumoniae*. WGS results have showed that the most prevalent mutation in the *mgrB* chromosomal gene was the MgrB<sup>C28S</sup> substitution, first described in this study. Plasmid mediated colistin resistance was not found (*mcr* 1-5 genes). MALDI-TOF MS analysis detected additional peak at 1971 m/z, which indicates *pmr*HFIJKLM operon mutations, which lead to reduced colistin susceptibility. MLST analysis showed that 94% of colistin-resistant community CPE isolates belonged to the

high risk clone ST101, together with the hospital isolates from Serbia, Slovenia, Turkey and Greece. All carbapenemase-producing ST101 isolates harbored the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene. This gene was located on the novel, hybrid plasmid pSRB\_OXA\_48, first described in this study.

**CONCLUSION:** Results of this study showed that enterobacteria resistant to carbapenems and colistin are widespread in the community. Clonal relatedness and clonal distribution of community isolates suggest that laboratory based detection and surveillance of CPE is highly recommended among community isolates in Belgrade in order to control spreading of the resistance and to prevent epidemics.

**Key words:** Carbapenemase-producing *Enterobacterales*, OXA-48, colistin, ST101, community, resistance

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Microbs and infection

**UDC Number:**



## SADRŽAJ

---

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Klasifikacija enterobakterija</b> .....	3
<b>1.2. Karakteristike enterobakterija</b> .....	4
<b>1.3. Infekcije izazvane enterobakterijama</b> .....	5
<b>1.4. Terapija infekcija izazvanih enterobakterijama</b> .....	5
<b>1.5. Mehanizmi rezistencije enterobakterija na karbapeneme</b> .....	8
<b>1.5.1. Aktivni efluks</b> .....	9
<b>1.5.2. Smanjena propustljivost</b> .....	10
<b>1.5.3. Enzimska razgradnja</b> .....	10
<b>1.6. Laboratorijska detekcija karbapenemaza</b> .....	14
<b>1.6.1. Fenotipska detekcija karbapenemaza</b> .....	15
<b>1.6.2. Molekularna detekcija karbapenemaza</b> .....	17
<b>1.7. Mehanizmi rezistencije enterobakterija na kolistin</b> .....	18
<b>1.8. Laboratorijska detekcija osetljivosti na kolistin</b> .....	19
<b>1.8.1. Fenotipske metode za utvrđivanje osetljivosti na kolistin</b> .....	19
<b>1.8.2. Molekularne metode za utvrđivanje osetljivosti na kolistin</b> .....	20
<b>1.9. Genotipizacija CPE</b> .....	20
<b>1.10. Epidemiologija CPE</b> .....	23
<b>1.11. CPE u vanbolničkoj populaciji</b> .....	24
<b>1.12. Radna hipoteza</b> .....	24
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	25
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	27
<b>3.1. Tip studije</b> .....	28
<b>3.2. Mesto i period istraživanja</b> .....	28
<b>3.3. Bakterijski izolati uključeni u studiju</b> .....	28
<b>3.4. Identifikacija i čuvanje izolata</b> .....	28
<b>3.5. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti</b> .....	29
<b>3.5.1. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti disk difuzionom metodom</b> .....	29
<b>3.5.2. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti u automatizovanom sistemu</b> .....	29
<b>3.5.3. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti bujon mikrodilucijom</b> .....	30
<b>3.6. Detekcija gena za karbapenemaze</b> .....	30
<b>3.6.1. Ekstrakcija nukleinske kiseline</b> .....	30
<b>3.6.2. Multiplex PCR gena za karbapenemaze</b> .....	31
<b>3.6.3. Elektroforeza u agaroznom gelu</b> .....	32
<b>3.7. Molekularna tipizacija</b> .....	32

3.7.1. ERIC-PCR.....	32
3.7.2. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	33
3.7.3. Analiza ERIC-PCR profila .....	33
3.8. Utvrđivanje mehanizama rezistencije na kolistin .....	33
3.8.1. MALDI-TOF MS analiza lipida A.....	34
3.8.2. Ekstrakcija DNK za WGS .....	34
3.8.3. WGS.....	35
3.8.4. Bioinformatička analiza .....	35
3.9. Procena potrebe za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem vanbolničkih CPE .....	35
3.10. Statistička analiza .....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Bakterijski izolati uključeni u studiju .....	38
4.2. Prikaz rezultata detekcije gena za karbapenemaze kod vanbolničkih izolata enterobakterija sa pozitivnim skriningom na produkciju karbapenemaza .....	39
4.2.1. Učestalost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija .....	39
4.2.2. Dokazivanje prisustva gena za karbapenemaze <i>multiplex</i> PCR metodom .....	40
4.2.3. Učestalost i distribucija gena za karbapenemaze.....	43
4.2.4. Genotipizacija karbapenemaza-produkujućih enterobakterija ERIC-PCR metodom .....	45
4.2.5. Filogenetska analiza .....	45
4.3. Osetljivost na antibiotike.....	53
4.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike disk difuzionom metodom .....	53
4.3.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike u automatizovanom sistemu .....	56
4.3.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na kolistin bujon mikrodilucionom metodom .....	57
4.4. Detekcija mehanizama rezistencije na kolistin .....	59
4.4.1. MALDI-TOF MS analiza lipida A kolistin-rezistentnih izolata .....	59
4.4.2. Molekularna tipizacija kolistin-rezistentnih izolata .....	60
4.4.3. Detekcija i karakterizacija plazmida .....	63
5. DISKUSIJA.....	66
6. ZAKLJUČCI .....	82
7. LITERATURA .....	85

## ***1. UVOD***

---

Enterobakterije su široko rasprostranjene u prirodi. Medicinski značajne vrste su različitog patogenog potencijala, od saprofitnih i uslovno patogenih vrsta koje pripadaju mikrobioti čoveka, pre svega digestivnog trakta, do striktno patogenih koje izazivaju bolest i kod potpuno zdravih osoba. Enterobakterije su među najčešćim laboratorijskim izolatima iz uzoraka humanog porekla. Izazivaju infekcije kod pacijenata svih uzrasta, koje mogu biti sporadične ali i epidemijskog karaktera, bilo u bolničkoj ili u vanbolničkoj sredini (1).

Poslednjih nekoliko decenija lečenje infekcija izazvanih enterobakterijama je kompromitovano značajnim porastom otpornosti ovih bakterija na antimikrobne agense. Posebno zabrinjavajuća je rezistencija enterobakterija na antibiotike „poslednje linije“, među kojima su karbapenemi i polimiksini. Globalni izveštaj Svetske zdravstvene organizacije (SZO) o nadzoru nad antimikrobnom rezistencijom pokazao je da u nekim delovima sveta uskoro neće biti odgovarajuće antibiotske terapije za lečenje i najbanalnijih infekcija. Zato je SZO karbapenem-rezistentne enterobakterije (engl. *Carbapenem-Resistant Enterobacterales*, CRE) svrstala na listu patogena prvog (kritičnog) prioriteta za usmeravanje istraživanja u oblasti razvoja novih antibiotika (2). Druga strategija za prevazilaženje ovog problema je primena „starih“ antibiotika, kao što su polimiksini.

### 1.1. Klasifikacija enterobakterija

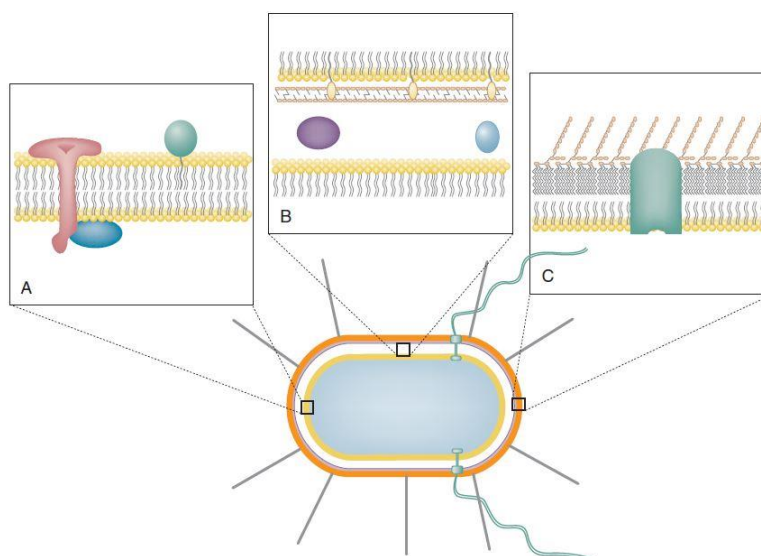
Enterobakterije pripadaju carstvu *Bacteria*, filumu *Proteobacteria*, klasi *Gammaproteobacteria*, redu *Enterobacterales*. Medicinski najznačajnije porodice, rodovi i vrste navedeni su u Tabeli 1 (1,3).

Tabela 1. Medicinski najznačajnije porodice, rodovi i vrste reda *Enterobacterales*.

Porodica	Rod	Vrsta
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
		<i>C. koseri</i>
		<i>C. amalonaticus</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> complex
	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		<i>K. oxytoca</i>
		<i>K. aerogenes</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>
		<i>Shigella</i>
<i>S. flexneri</i>		
<i>S. sonnei</i>		
<i>S. boydii</i>		
<b><i>Erwiniaceae</i></b>	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i> group
<b><i>Hafniaceae</i></b>	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
<b><i>Morganellaceae</i></b>	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>
		<i>P. vulgaris</i>
	<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i>
<i>P. rettgeri</i>		
<b><i>Yersiniaceae</i></b>	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i>
		<i>Y. enterocolitica</i>
		<i>Y. pseudotuberculosis</i>

## 1.2. Karakteristike enterobakterija

Enterobakterije su Gram-negativne bakterije, štapićastog oblika, dužine 1-6  $\mu\text{m}$ , prečnika oko 0,5  $\mu\text{m}$ , većina na površini poseduje pile, a pokretne vrste jednu ili više flagela. Genetički materijal se sastoji od jednog cirkularnog hromozoma, veoma često sadrže i plazmide različitih veličina. Citoplazma je okružena polupropusnom citoplazmatskom membranom fosfolipidnog sastava, poput membrane eukariotskih ćelija. U fosfolipidni dvosloj uronjeni su različiti transmembranski proteini koji omogućavaju transport materija, učestvuju u metaboličkim procesima, ali i proteini koji ulaze u sastav efluks pumpi koje izbacuju antimikrobne agense iz ćelije. Citoplazmatsku membranu okružuje ćelijski zid, čija se unutrašnja membrana sastoji od peptidoglikana, a spoljašnju čini fosfolipidni matriks u koji su uronjeni porini, lipopolisaharidi i drugi značajni makromolekuli. Između citoplazmatske membrane i ćelijskog zida nalazi se periplazmatski prostor ispunjen brojnim strukturnim i funkcionalnim proteinima, među kojima su i enzimi koji razgrađuju antimikrobne agense (beta-laktamaze, fosforilaze aminoglikozida i drugi) (1,4,5). Na Slici 1 dat je shematski prikaz strukture ćelije enterobakterija.



Slika 1. Shematski prikaz strukture ćelije enterobakterija. A, citoplazmatska membrana; B, periplazmatski prostor; C, ćelijski zid. Preuzeto iz Bennett JE i sar., 2014. (1), uz izmene.

Faktori virulencije enterobakterija su brojni i raznovrsni. Različiti adhezini na površini ćelije omogućavaju vezivanje za odgovarajuće receptore na ćelijama domaćina, što predstavlja prvi korak ka uspostavljanju infekcije. Pokretljivost značajno doprinosi invazivnosti i adekvatnom reagovanju na faktore sredine. Fazne i antigenske varijacije, kao i produkcija kapsule, omogućavaju izbegavanje imunskog odgovora domaćina (1,4,5).

Faktor virulencije zajednički svim vrstama je lipopolisaharid (LPS), koji se nalazi u spoljašnjoj membrani. Odgovoran je za niz simptoma (povišena temperatura, leukopenija, hemoragije, hipotenzija), kao i za najteži, potencijalno letalni oblik infekcije – endotoksični šok. Takođe, predstavlja barijeru za lipofilne molekule poput deterdženata, boja, ali i za hidrofobne antibiotike (1,4,5).

Određene vrste enterobakterija produkuju egzotoksine, koji se najčešće izlučuju preko sekretornih sistema faktora virulencije (šest tipova, T1SS-T6SS). Formiranje biofilma je veoma važno za patogenezu određenih infekcija (urinarni trakt, enterokolitis i infekcije povezane sa medicinskim implantatima) (1,5).

### 1.3. Infekcije izazvane enterobakterijama

Enterobakterije mogu izazvati praktično bilo koji tip infekcija. Striktne patogene vrste uglavnom izazivaju intestinalne infekcije (5). Bakterije rodova *Salmonella* i *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, kao i dijarigeni tipovi *E. coli* (enteropatogena *E. coli*, EPEC, enterotoksigena *E. coli*, ETEC, enterohemoragična *E. coli* EHEC, posebno serotip O157:H7, enteroinvazivna *E. coli*, EIEC, enteroagregativna *E. coli*, EAEC, difuzno-adherentna *E. coli*, DAEC, adherentno-invazivna *E. coli*, AIEC) su izazivači dijarealnih i dizenteričnih sindroma, sa mogućim komplikacijama kao što je septikemija (npr. tifoidna groznica koju izaziva *S. Typhi*). *Yersinia pestis*, uzročnik kuge, odgovorna je za tri pandemije u prošlosti, ali je i danas aktivna najviše u subsaharskoj Africi (1,4,5).

Oportunističke enterobakterije značajno su zastupljene u sastavu normalne crevne mikrobiote i izazivaju pretežno ekstraintestinalne infekcije, sa izuzetkom prethodno opisanih patotipova *E. coli*. Veliki značaj enterobakterije imaju kao izazivači bolničkih infekcija. Zahvaljujući brojnim savremenim, složenim medicinskim intervencijama (operativni zahvati, invazivne endoskopske procedure, primena imunosupresivne i antibiotske terapije) olakšano je nastajanje infekcija izazvanih oportunističkim enterobakterijama, pre svega bakterijama iz rodova *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* i *Proteus*. Najčešći tipovi bolničkih infekcija su pneumonija, infekcije urinarnog trakta, infekcije rana i operativnog mesta, apscesi, meningitis, septikemija i druge (1,4). Lečenje ovih infekcija predstavlja veliki problem, jer su bolnički sojevi enterobakterija uglavnom multirezistentni - rezistentni na bar jedan antibiotik iz tri ili više različitih kategorija (engl. *Multidrug-Resistant*, MDR) (6).

MDR sojevi predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, posebno zbog širenja u vanbolničku sredinu. Uspešne vanbolničke sojeve karakteriše stabilan MDR fenotip, nezavistan od selektivnog pritiska antibiotika, sposobnost kompeticije sa bakterijama mikrobiote kože, nosa, digestivnog trakta, opstanak u prisustvu odbrambenih mehanizama imunog sistema zdravih, imunokompetentnih osoba, kao i sposobnost stvaranja biofilma u odsustvu medicinskih implantata (keteteri, proteze i drugo). Uglavnom izazivaju urinarne infekcije, pneumonije i septikemije, a najčešći izazivači su *E. coli* i *K. pneumoniae* koje produkuju beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*, ESBL) (7).

### 1.4. Terapija infekcija izazvanih enterobakterijama

Poslednjih decenija terapija infekcija izazvanih enterobakterijama predstavlja poseban izazov usled ekstenzivnog širenja rezistencije na antibiotike.

Beta-laktamski antibiotici predstavljaju lekove prvog izbora za terapiju većine infekcija izazvanih enterobakterijama: urinarne infekcije, bakterijemija, pneumonija, intraabdominalne infekcije. Prvi antibiotici koji su se koristili u terapiji sredinom pedesetih godina XX veka bili su aminopenicilini. Za manje od 10 godina pojavila se rezistencija na ove antibiotike, posredovana beta-laktamazama (8,9).

Sredinom 80-ih godina XX veka dolazi do ekspanzije ESBL pozitivnih klonova enterobakterija, rezistentnih na sve peniciline, cefalosporine, izuzev cefamicina, i na monobaktame. Značajan napredak u lečenju infekcija izazvanih ovim sojevima predstavljalo je uvođenje kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaza (npr. amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, ampicilin sa sulbaktamom, piperacilin sa tazobaktamom i drugi) (10,11). Međutim, gotovo istovremeno sa ekspanzijom ESBL klonova, došlo je do širenja drugog tipa rezistencije, posredovane AmpC enzimima, na koje ove kombinacije antibiotika ne deluju (11). Uvođenje karbapenema u kliničku praksu omogućilo je uspešnu terapiju infekcija izazvanih ESBL i AmpC pozitivnim sojevima (11).

Pored beta-laktama, za terapiju infekcija koje izazivaju enterobakterije sredinom 80-ih godina su uvedeni fluorohinoloni, pre svih ciprofloksacin. Samo godinu dana nakon početka njihove primene javila se rezistencija na ciprofloksacin (Slika 2). Značajno širenje rezistentnih klonova utvrđeno je krajem XX veka, prvenstveno kod invazivnih izolata *E. coli* i *Salmonella* spp. (10).

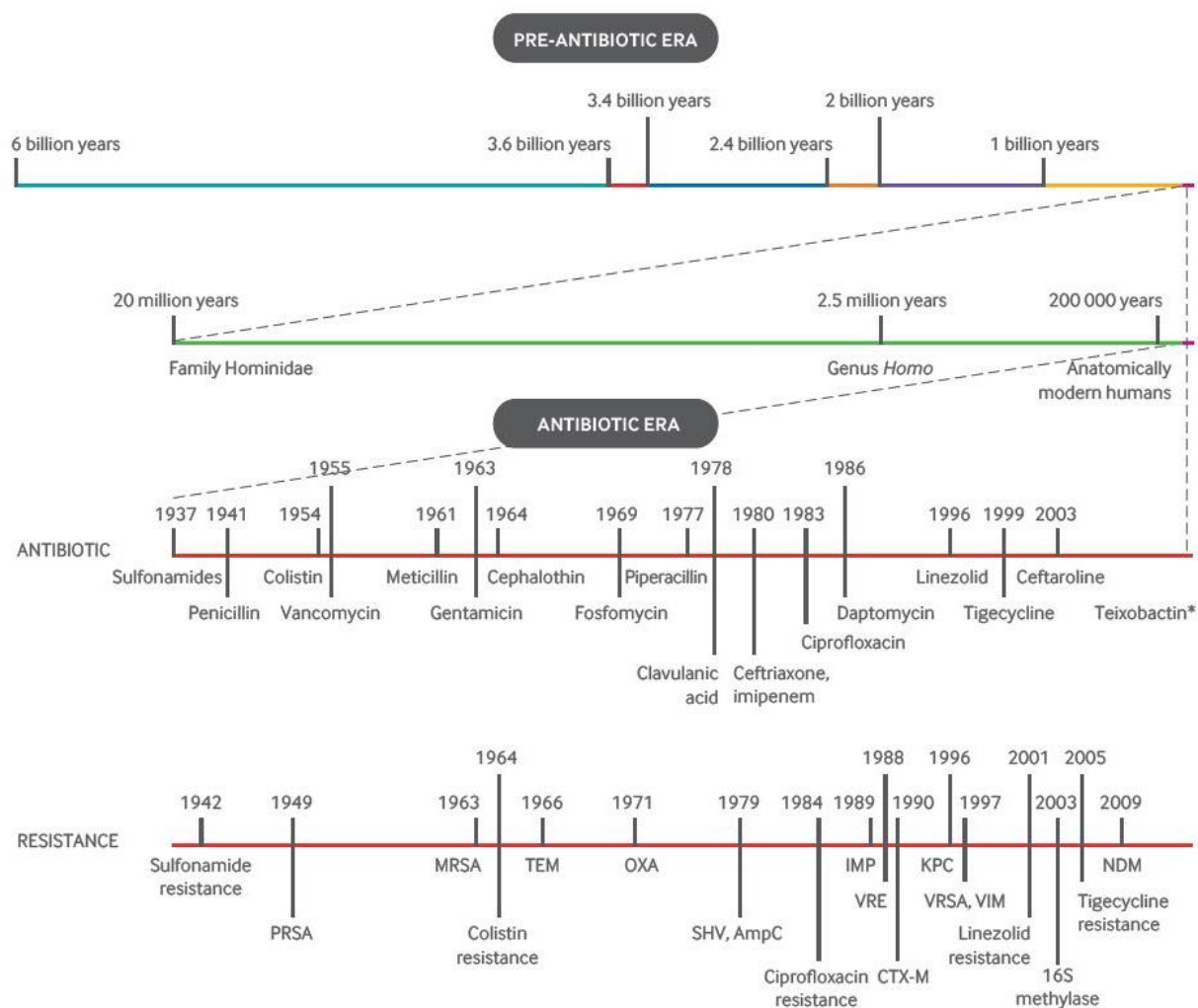
Primena aminoglikozida nije se pokazala dovoljno efikasnom u odnosu na druge antibiotike u terapiji infekcija izazvanih enterobakterijama. Pojava neželjenih dejstava tokom primene ovih antibiotika, pre svega ototoksičnost i nefrotoksičnost, ograničila je njihovu upotrebu. Stoga se aminoglikozidi ne preporučuju kao empirijska terapija u regijama sa niskim nivoom rezistencije na beta-laktame, ali predstavljaju dobru alternativu u terapiji infekcija izazvanih ESBL i AmpC sojevima, posebno u kombinaciji sa karbapenemima (11).

Ključni događaj koji je kompromitovao lečenje infekcija izazvanih enterobakterijama bila je pojava rezistencije na karbapeneme, posebno rezistencije posredovane karbapenemazama. Jedna od terapijskih opcija za infekcije izazvane karbapenemazaprodukujućim enterobakterijama (engl. *Carbapenemase-producing Enterobacterales*, CPE) je tigeciklin. Ovaj antibiotik predstavlja dobru alternativu za lečenje infekcija kože i mekih tkiva, kao i intraabdominalnih infekcija, ali ne postiže dovoljne koncentracije u krvi i urinu pri standardnom režimu doziranja (11,12).

Danas se u lečenju infekcija izazvanih CPE često primenjuju „stari“ antibiotici iz grupe polimiksina, kao što je kolistin. Polimiksini su otkriveni još 40-ih godina XX veka, ali je njihova upotreba ograničena zbog nefrotoksičnih i neurotoksičnih neželjenih efekata, kao i zbog otkrića novih, bezbednijih antibiotika. Savremene studije su omogućile bolje razumevanje farmakokinetičkih i farmakodinamskih parametara i optimizaciju doznog režima ovih antibiotika. Istraživanja su pokazala da je kolistin efikasniji ukoliko se primenjuje kao kombinovana terapija, i to sa karbapenemima, a u slučaju CPE sa tigeciklinom, aminoglikozidima i fosfomicinom (9-11). Još jedan od „starih“ antibiotika je i fosfomicin, koji se prvenstveno preporučuje za terapiju urinarnih infekcija, ali se može primenjivati i kod životno ugrožavajućih infekcija u nedostatku drugih terapijskih opcija (11).

Međutim, povećana primena polimiksina dovela je do pojave rezistencije i na ove antibiotike „poslednje linije“, i pojave panrezistentnih sojeva enterobakterija – rezistentnih na sve dostupne antimikrobne agense.

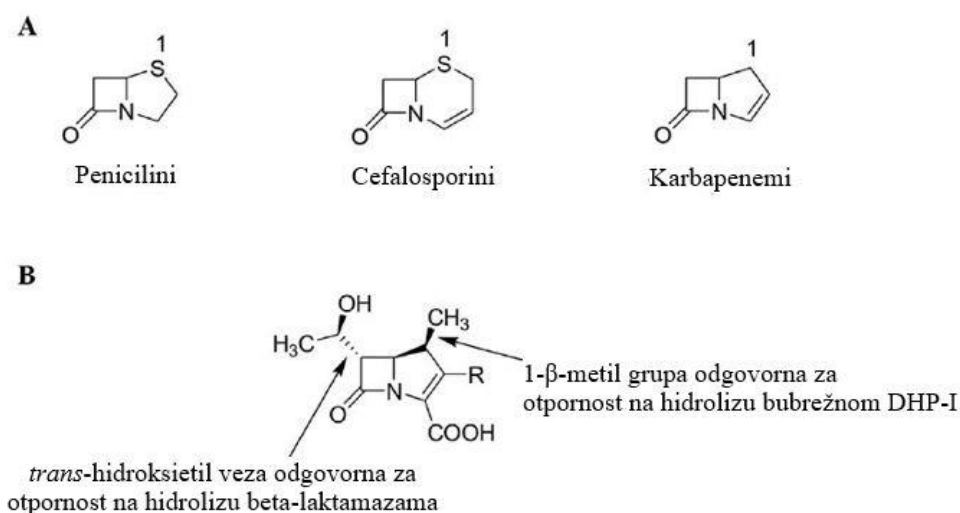




Slika 2. Evolucija rezistencije na antibiotike. Preuzeto iz Iredell J. et al., 2016. (9).

## 1.5. Mehanizmi rezistencije enterobakterija na karbapeneme

Karbapenemi su beta-laktamski antibiotici sa najširim spektrom delovanja, koji deluju i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije. Prvi karbapenemi su izolovani iz *Streptomyces cattleya*. Po strukturi su slični penicilinima, ali umesto atoma sumpora na poziciji 1 petočlanog prstena imaju atom ugljenika, a između ugljenikovih atoma na poziciji C2 i C3 imaju nezasićenu vezu. Ova veza, zajedno sa bočnim trans-hidroksietilnim lancem na poziciji C6, obezbeđuje otpornost na hidrolizu beta-laktamazama ESBL i AmpC tipa i ključna je za aktivnost ovih antibiotika (Slika 3A) (13). Prvi karbapenem u kliničkoj upotrebi, imipenem, osetljiv je na dejstvo bubrežne dehidropeptidaze (DHP-I), te se mora aplikovati sa inaktivatorom ovog enzima – cilastatinom. Noviji karbapenemi (meropenem, ertapenem, doripenem, razupenem, tebipenem) imaju 1- $\beta$ -metil grupu koja im obezbeđuje otpornost na DHP-I (Slika 3B) (13). Kao i ostali beta-laktamski antibiotici, lako prolaze kroz spoljašnju membranu kroz specifične porinske kanale OmpF (engl. *Outher Membrane Protein F*) i OmpC (engl. *Outher Membrane Protein C*), i inhibiraju sintezu ćelijskog zida vezivanjem za penicilin-vezujuće proteine (PVP) delujući baktericidno (1,13).



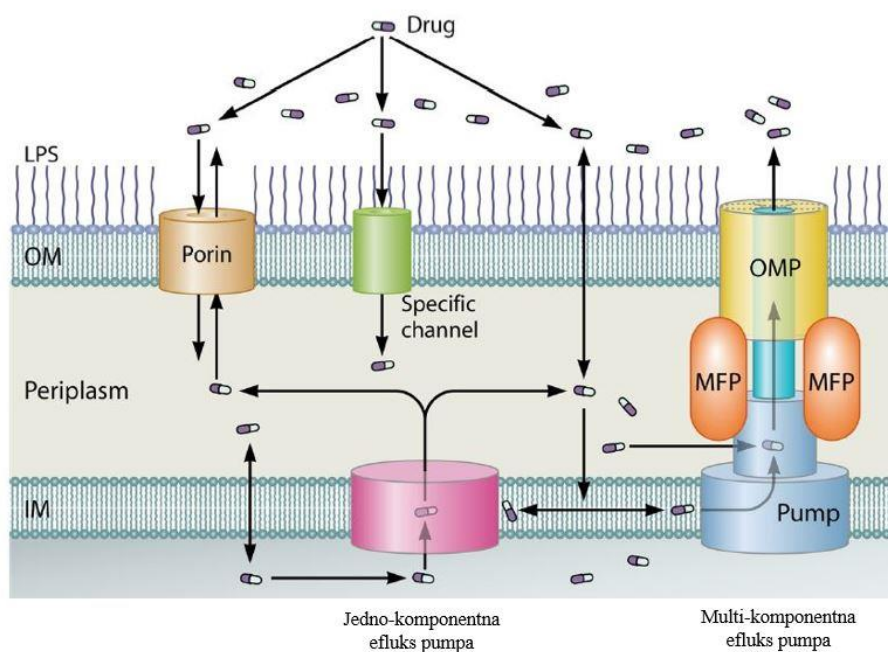
Slika 3. A. Prstenovi penicilina, cefalosporina i karbapenema; B. Najvažnije strukturne karakteristike karbapenema. Preuzeto iz El-Gamal, Mohammed I i sar., 2017. (13), uz izmene.

Najvažniji mehanizmi rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija su (14):

- aktivni efluks;
- smanjena propustljivost;
- enzimaska razgradnja.

### 1.5.1. Aktivni efluks

Efluks pumpe predstavljaju jedan od mehanizama rezistencije kod enterobakterija na različite antibiotike, pre svega na fluorohinolone, makrolide, tetracikline i tigeciklin, ali je uloga u rezistenciji na beta-laktamske antibiotike dugo bila nejasna (14). Najbolje je proučena trokomponentna efluks pumpa AcrAB-TolC iz RND familije kod *E. coli*. Ona predstavlja vrlo efikasan sistem koji se sastoji iz unutrašnje komponente u ćelijskoj membrani, adapterskog proteina u periplazmatskom prostoru (engl. *Membrane Fusion Protein*, MFP) i proteinske komponente u spoljašnjoj membrani (OMP). Ovaj složeni sistem izbacuje antibiotik direktno izvan ćelije, i njegov ponovni ulazak u ćeliju zavisi od propustljivosti spoljašnje membrane za dati lek (Slika 4.) (15). S obzirom na to da su karbapenemi hidrofилni molekuli koji lako prolaze kroz spoljašnju membranu, smatra se da nisu važan supstrat ovog efluks sistema, odnosno da ne dolazi do značajnog povećanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kao što je slučaj za druge antimikrobne agense. Međutim, novija istraživanja su pokazala da aktivni efluks ipak ima ulogu u rezistenciji na karbapeneme, ali u kombinaciji sa drugim mehanizmima (smanjena propustljivost i/ili enzimaska degradacija) (15).



Slika 4. Lokalizacija efluks pumpi i put leka (influks i efluks) kroz spoljašnju i unutrašnju membranu Gram-negativnih bakterija. Preuzeto iz Li XZ i sar., 2015. (15), uz izmene.

### 1.5.2. Smanjena propustljivost

Propustljivost ćelijske membrane enterobakterija za antimikrobne agense zavisi od prisustva odgovarajućih porina i fizičko-hemijskih karakteristika leka. Manji, hidrofilni antibiotici, poput imipenema, relativno lako prolaze kroz ćelijske membrane (1). Transport je regulisan porinima od 35 kDa i 36 kDa, koji su kodirani *omp35*-like i *omp36*-like genima (17). Pavez i saradnici su pokazali da pod selektivnim pritiskom imipenema dolazi do smanjenja propustljivosti ćelijske membrane uglavnom zbog mutacija gena za porin od 35 kDa (17).

U drugoj studiji, Doumith i sar., utvrđena je smanjena ekspresija ili nedostatak ovih glavnih porina kodiranih *omp35*-like i *omp36*-like genima kod izolata *K. pneumoniae*, *E. coli* i *Enterobacter* spp. Detektovani su različiti mehanizmi genetskih mutacija: point mutacije, često i insercije u kodirajućem regionu, zatim point mutacije u regionu promotora, ali i nedovoljno definisane promene na nivou translacije koje rezultuju smanjenom ugradnjom porina u ćelijsku membranu. Međutim, ključna mutacija nije definisana (18).

Rezultati obe studije su saglasni u zaključku da smanjena propustljivost nije dovoljna za klinički ispoljenu rezistenciju na karbapeneme, i da mora biti udružena sa drugim mehanizmima, pre svega sa produkcijom beta-laktamaza ESBL i AmpC tipa.

### 1.5.3. Enzimaska razgradnja

Najvažniji mehanizam rezistencije na karbapeneme je produkcija enzima iz grupe beta-laktamaza - karbapenemaza. Kod enterobakterija prvi put su dokazane kod izolata *Serratia marcescens* (engl. *Serratia marcescens* enzymes, SME) 1980-ih godina u Francuskoj i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD). Do danas je opisano više od 650 različitih varijanti karbapenemaza (12). Kao što je prethodno navedeno, AmpC i ESBL tip beta-laktamaza takođe imaju ulogu u rezistenciji na karbapeneme, ali u kombinaciji sa aktivnim efluksom ili smanjenom propustljivošću ćelijskih membrana.

Beta-laktamaze predstavljaju veoma raznovrsnu grupu enzima, za koju postoje brojne klasifikacije. Jedna od prvih jeste klasifikacija po Ambleru, bazirana na strukturnim (molekularnim) karakteristikama ovih enzima (19), dok su Bush-Jacoby beta-laktamaze klasifikovali prema funkcionalnim osobinama, u odnosu na supstrat i inhibitor funkcije enzima (Tabela 2) (20).

Tabela 2. Klasifikacija beta-laktamaza po Bush-Jacoby-u i Ambleru.

Bush-Jacoby grupa	Molekularna klasa po Ambleru	Karakteristike	Reprezentativni enzimi
1	C	Hidrolizuju cefalosporine i cefamicine Ne inhibira ih CLA i TZB Visok afinitet za aztreonam	<i>E. coli</i> AmpC CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Hidrolizuju peniciline, cefamicine, cefalosporine proširenog spektra, monobaktame Ne inhibira ih CLA i TZB	GC-1, CMY-37
2a	A	Hidrolizuju peniciline Inhibira ih CLA i TZB	PC1 i druge stafilokokne penicilinaze
2b	A	Hidrolizuju peniciline i rane cefalosporine (cefaloridin, cefazolin, cefalotin) Inhibira ih CLA i TZB	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
2be	A	Hidrolizuju peniciline, cefalosporine proširenog spektra, monobaktame Inhibira ih CLA i TZB	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44 (Toho-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26
2br	A	Hidrolizuju peniciline i rane cefalosporine Nepotpuna inhibicija sa CLA	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	Hidrolizuju peniciline, cefalosporine proširenog spektra, monobaktame Nepotpuna inhibicija sa CLA i TZB	CMTs: TEM-50, TEM-68, TEM-89
2c	A	Hidrolizuju karbeniciline Inhibira ih CLA i TZB	PSE-1, CARB-3
2d	D	Hidrolizuju kloksacilin ili oksacilin Nepotpuna inhibicija sa CLA	OXA-1, OXA-10
2de	D	Hidrolizuju peniciline, cefalosporine proširenog spektra Nepotpuna inhibicija sa CLA	ESBLs: OXA-11, OXA-15
2df	D	Hidrolizuju karbapeneme i kloksacilin ili oksacilin Nepotpuna inhibicija sa CLA	OXA-23, OXA-48
2e	A	Hidrolizuju cefalosporine Inhibira ih CLA i TZB, ali ne i aztreonam	CepA
2f	A	Hidrolizuju karbapeneme, cefalosporine, peniciline i cefamicine Nepotpuna inhibicija sa CLA i TZB	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
3a	B	Hidrolizuju sve beta-laktame osim monobaktama Inhibira ih EDTA i helatori metalnih jona, ne inhibira ih CLA i TZB	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
3b	B	Hidrolizuju uglavnom karbapeneme Inhibira ih EDTA i helatori metalnih jona, ne inhibira ih CLA i TZB	CphA, Sfh-1

ESBL,  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra; CLA, klavulanska kiselina; TZB, tazobaktam; TEM-1, Temoneira-1; SHV-1, sulfhydryl varijanta-1; CTX-M, cefotaksim-M; GES, *Guyana extended-spectrum*  $\beta$ -laktamaza; KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaza; NDM, New Delhi metalo-  $\beta$ -laktamaza; IMP, imipenem hidrolizujuća  $\beta$ -laktamaza; VIM, *Verona integron-encoded* metalo-  $\beta$ -laktamaza; GIM, *German imipenemase*  $\beta$ -laktamaza; AmpC, ampicilin C; OXA, oksacilin.

### 1.5.3.1. Uloga AmpC beta-laktamaza u rezistenciji na karbapeneme

AmpC enzimi pripadaju molekularnoj klasi C po Ambleru (otuda i njihov naziv), odnosno 1. grupi po Bušovoj klasifikaciji. Karakteriše ih prisustvo serina u aktivnom mestu, bolja hidroliza cefalosporina u odnosu na peniciline, i otpornost na inhibitore beta-laktamaza (klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam). Hidrolizuju peniciline, cefalosporine širokog spektra, oksimino cefalosporine, cefamicine i varijabilno aztreonam. Enzimaska aktivnost ka cefalosporinima četvrte generacije (npr. cefepim) je mala, a minimalna, gotovo zanemarljiva, u odnosu na karbapeneme (21).

Konstitutivne AmpC beta-laktamaze, hromozomski kodirane (cAmpCs), javljaju se kod nekih enterobakterija, pre svega kod roda *Enterobacter*, zatim kod *S. marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* i kod *Morganella morganii*. Karakteristične su za sojeve koji uzrokuju bolničke epidemije. Plazmidski kodirane AmpC (pAmpCs) su široko rasprostranjene kod enterobakterija, pre svega onih koje izazivaju vanbolničke infekcije (21).

Smanjena osetljivost na karbapeneme može biti posredovana AmpC enzimima u kombinaciji sa gubitkom porina spoljašnje membrane. Molekuli karbapenema se mogu kovalentno vezati u periplazmatskom prostoru Gram-negativnih bakterija za AmpC enzime. Ukoliko postoji hiperprodukcija AmpC enzima uz smanjenu propustljivost, dolazi do fenotipskog ispoljavanja rezistencije na karbapeneme. Ovakav mehanizam opisali su van Boxtel i sar. kod *E. coli* (22). Da bi se ispoljio, neophodna je mutacija koja dovodi do smanjene ekspresije porina, kao i druga mutacija, ovde utvrđena kod plazmidskog *bla<sub>cmv-2</sub>* gena za AmpC, koja rezultuje hiperprodukcijom ovog enzima. Rezultati studije idu u prilog tome da su ove mutacije međusobno zavisne, odnosno da mutacije gena za porine indukuju hiperekspresiju gena za enzim.

Plazmidski kodirane AmpC beta-laktamaze imaju veliki epidemiološki značaj, još od 1990-ih godina, kada je zapaženo širenje klonova sa velikim brojem kopija plazmida, i dokazan prenos ovih plazmida između različitih vrsta.

### 1.5.3.2. ESBL enzimi i rezistencija na karbapeneme

Beta-laktamaze proširenog spektra, ESBL, pripadaju Amblerovoj klasi A, odnosno grupi 2b po Bušovoj klasifikaciji. U aktivnom mestu ovi enzimi imaju serin. Hidrolizuju peniciline, cefalosporine širokog spektra, oksimino cefalosporine, monobaktame, ali ne deluju na cefamicine i karbapeneme. Inhibiraju ih inhibitori beta-laktamaza.

Prve ESBL su detektovane 1990-ih kod izolata *K. pneumoniae*, izazivača bolničke epidemije. To su bile SHV-1 tip ESBL (engl. *sulphydryl reagent variable  $\beta$ -lactamase*, SHV) i TEM-1 i TEM-2 tipovi (engl. *Temoneira  $\beta$ -lactamase*, TEM). Danas postoji veliki broj varijanti ovih enzima, preko 400. Međutim, u poslednjih 10-ak godina dominantan je CTX-M (engl. *Cefotaxime-M*, CTX-M) tip ESBL, sa više od 180 varijanti (12). Globalno je najrasprostranjenija CTX-M-15, najviše u Aziji, Africi i Južnoj Americi, gde je u pojedinim regijama i do 50% izolata *E. coli* i *K. pneumoniae* ESBL pozitivno (23). Ovako uspešnom širenju doprinosi plazmidska lokalizacija *bla<sub>CTX-M</sub>* gena. Obično se nalazi na IncF plazmidu multirezistentnih klonova, kao što je *E. coli* ST131, koji se dominantno šire u vanbolničkoj sredini, i retko su opisani kao izazivači bolničkih infekcija (23).

Kao i AmpC enzimi, ESBL dovode do rezistencije na karbapeneme udruženo sa smanjenom propustljivošću ćelijskih membrana. Ovim mehanizmom je najviše pogođen ertapenem, usled svoje veličine i više negativnog naelektrisanja, zbog čega slabije difunduje kroz preostale, sporedne porinske kanale nakon mutacije glavnih porina (18).

### 1.5.3.3. Karbapenemaze

Karbapenemaze pripadaju Amblerovim klasama A, B i D, odnosno funkcionalnim grupama 2f, 2df i 3. Hidrolizuju sve beta-laktamske antibiotike i mogu biti kodirane kako hromozomskim genima, tako i genima lociranim na plazmidu (12).

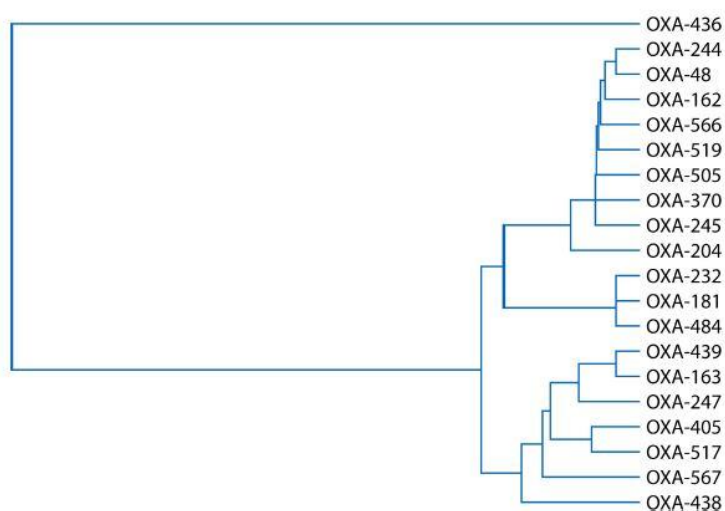
Prve karbapenemaze, koje spadaju u Amblerovu klasu A, detektovane su na hromozomu izolata *E. cloacae* u Francuskoj 1996. godine, i nazvane su Nmc-A (engl. *Non-metallo-carbapenemase-A*, Nmc-A) (24). Danas se ovaj tip enzima retko javlja. Hromozomski kodirana IMI-1 (engl. *Imipenem-resistant*, IMI) je opisana prvi put kod izolata *E. cloacae* u Severnoj Americi. Međutim, najčešći tip hromozomskih karbapenemaza su SME enzimi, koji se sporadično javljaju, najčešće u Engleskoj i SAD (25).

Početkom XX veka u različitim delovima sveta otkrivene su prve plazmidske karbapenemaze, GES tipa (engl. *Guiana extended-spectrum*, GES) na integronu 1 (24). Otkriće plazmidski kodirane serin-karbapenemaze kod *K. pneumoniae*, nazvane KPC (engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, KPC) krajem XX veka, predstavljalo je početak globalne diseminacije CPE. Danas su KPC najrasprostranjenije karbapenemaze Amblerove grupe A. Opisano je 24 tipa ovih enzima, a najvažniji tipovi su KPC-2 i KPC-3 (12). Pripadaju funkcionalnoj klasi 2f i hidrolizuju sve peniciline, cefalosporine, karbapeneme i monobaktame, ali i inhibitore beta-laktamaza. Plazmidi nosioci  $bla_{KPC}$  gena na visoko konzerviranom transpozonu Tn4401 najčešće sadrže i gene rezistencije na aminoglikozide i fluorohinolone, što značajno sužava terapijske mogućnosti kod infekcija izazvanih ovim MDR sojevima (24). Izolati enterobakterija koji imaju  $bla_{KPC}$  gen pokazuju različit stepen rezistencije na karbapeneme, od osetljivih, do rezistencije visokog nivoa koja je obično udružena sa većim brojem kopija  $bla_{KPC}$  gena i gubitkom porina Omp35 i Omp36 tipa (24).

Karbapenemaze Amblerove klase B, odnosno metalo-beta-laktamaze (MBL), karakteriše neophodnost  $Zn^{2+}$  jona za ispoljavanje enzimske aktivnosti. Stoga helirajući agensi (npr. etilendiamintetrasirćetna kiselina, EDTA) inhibiraju funkciju ovih enzima. MBL hidrolizuju sve beta-laktamske antibiotike osim monobaktama, i nisu inhibirane klasičnim inhibitorima beta-laktamaza (klavulanskom kiselinom, sulbaktamom ili tazobaktamom) (24). Hromozomske MBL su retke kod enterobakterija za razliku od plazmidskih, koje su prvi put otkrivene kod izolata *S. marcescens* u Japanu 1990. godine, tzv. IMP (engl. *Imipenem resistant*, IMP). Narednih 15-ak godina nije uočeno značajno širenje ovih sojeva, ali zbog korišćenja karbapenema u terapiji infekcija izazvanih ESBL produkujućim bakterijama, dolazi do porasta zastupljenosti plazmidskih MBL kod enterobakterija (25). Pored 53 varijante IMP enzima (12), jedan od najčešćih je VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*, VIM) karbapenemaza. Nakon prve opisane kod *Pseudomonas aeruginosa* ubrzo potom su detektovane i kod enterobakterija, a danas je od 43 tipa najčešći VIM-2 (12,24). 2008. godine prvi put je detektovana NDM MBL (engl. *New Delhi metallo-β-lactamase*, NDM) u Indiji, odakle se mnogo brže u odnosu na ostale MBL enzime raširila prvo u Evropu, a potom i ostale delove sveta. Opisano je 14 varijanti NDM enzima (12). MBL pozitivni sojevi uglavnom pokazuju MDR profil, poseduju gene i za druge beta-laktamaze (TEM-1, SHV i CTX-M), kao i za rezistenciju na aminoglikozide, fluorohinolone, rifampicin i antagoniste folata (25).

Oksacilinaze (engl. *Oxacilinase*, OXA) su beta-laktamaze Amblerove klase D, koje prema Bušovoj klasifikaciji spadaju u 2d grupu. Hidrolizuju peniciline, prvu generaciju cefalosporina, ali slabo deluju na cefalosporine proširenog spektra. Aktivnost prema karbapenemima je slabija u odnosu na ostale tipove karbapenemaza, ali se fenotipska rezistencija na karbapeneme često ispoljava kod OXA produkujućih izolata. Razlog je udružena produkcija drugih karbapenemaza (NDM, VIM, KPC), ESBL i AmpC enzima, izmena proteina spoljašnje membrane, pojačan efluks, ali i povećanje transkripcije preko aktivacije promotora ili povećanja broja kopija gena za OXA enzim (24,26). Ovo je vrlo heterogena grupa sa preko 750

varijanti enzima (27). Kod enterobakterija najvažniji i najrasprostranjeniji tip je OXA-48, otkriven u Turskoj 2003. godine kod MDR izolata *K. pneumoniae*. Gen je lociran na IncL/M tipu plazmida, čijim sekvenciranjem je utvrđeno da je *bla*<sub>OXA-48</sub> gen udružen sa insercionom sekvencijom IS1999, u okviru kompozitnog transpozona Tn1999. Na ovaj način je olakšana transmisija *bla*<sub>OXA-48</sub> gena (24). Postoji 11 varijanti OXA-48, grupisanih kao OXA-48-like enzimi. Najčešći tipovi su OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162 i OXA-244, navedenim redosledom. Međusobno pokazuju 87% sličnosti u aminokiselinskom sastavu (27). Filogenetsko stablo dobijeno analizom aminokiselinskih sekvenci metodom prosečne udaljenosti između grupa (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*, UPGMA) OXA-48-like enzima enterobakterija prikazano je na Slici 5 (27).



Slika 5. UPGMA filogenetsko stablo OXA-48 produkujućih enterobakterija dobijeno ClustalW2 analizom aminokiselinskih sekvenci. Preuzeto iz Pitout JDD i sar., 2019. (27).

### 1.6. Laboratorijska detekcija karbapenemaza

Prisustvo gena za karbapenemaze ne dovodi obavezno do fenotipskog ispoljavanja rezistencije na karbapeneme, koja zavisi od nivoa ekspresije ovih gena, karakteristika određenog tipa enzima, kao i postojanja drugih mehanizama rezistencije (28). Međutim, geni za karbapenemaze se veoma lako prenose između bakterija. Zbog toga je njihova laboratorijska detekcija, iako nema direktni uticaj na kliničku kategorizaciju osetljivosti na karbapeneme, izuzetno važna za kontrolu infekcija i ima veliki javno-zdravstveni značaj (28,29). Dva osnovna načina detekcije karbapenemaza jesu fenotipsko i molekularno određivanje, ali nijedna metoda ne može detektovati sve potencijalne mehanizme rezistencije na karbapeneme (30).



## 1.6.1. Fenotipska detekcija karbapenemaza

### 1.6.1.1. Skrining na produkciju karbapenemaza

Evropsko udruženje za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) preporučuje skrining na produkciju karbapenemaza kod enterobakterija prema odgovarajućim kriterijumima, koji se odnose na utvrđivanje smanjene osetljivosti na meropenem. Pri rutinskom testiranju osetljivosti, pozitivan skrining predstavlja vrednost MIK-a za meropenem veći od 0,025 mg/L, odnosno prečnik zone inhibicije rasta (ZIR) manji od 28 mm za disk meropenema od 10 µg. Dodatni kriterijum za izolate koji imaju ZIR između 25-27 mm jeste i rezistencija na piperacilintazobaktam i/ili temocilin. Kod izbora antibiotika za skrining, meropenem pokazuje optimalni odnos osetljivosti i specifičnosti za detekciju produkcije karbapenemaza. Iako ertapenem ima najveću osetljivost, ne preporučuje se za skrining zbog niske specifičnosti, jer predstavlja dobar supstrat za ESBL i AmpC tip beta-laktamaza u prisustvu drugih mehanizama rezistencije (28,29).

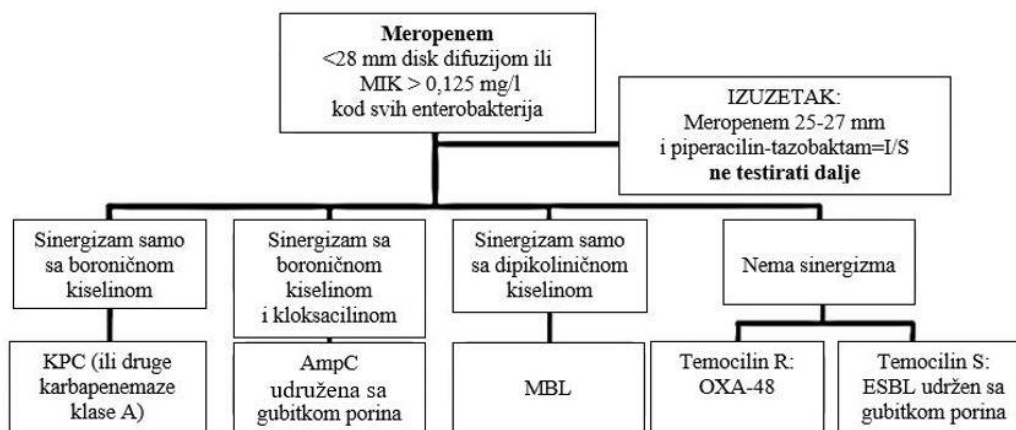
Detekcija CPE bazirana na izolaciji bakterija upotrebljava se za skrining pacijenata (obično iz uzorka rektalnog brisa ili fecesa) radi pravovremene primene mera za kontrolu širenja multirezistentnih sojeva, pre svega u bolničkim uslovima. U tu svrhu se mogu koristiti selektivno-diferencijalne podloge (npr. *Mac Conkey* agar) sa diskom meropenema od 10 µg, radi izolacije sojeva koji rastu u ZIR manjoj od 28 mm od centra diska. Brojne komercijalno dostupne hromogene podloge omogućavaju izolaciju CPE iz uzorka, ali imaju različitu senzitivnost za različite tipove karbapenemaza, uglavnom nisku za OXA-48 tip. Jedna od najnovijih, SUPERCARBA, koju su razvili Nordman i sar., zahvaljujući svom sastavu ima senzitivnost 96,5% za OXA-48 karbapenemaze (29).

### 1.6.1.2. Potvrdni testovi za karbapenemaze

Ukoliko se skriningom utvrdi smanjena osetljivost na karbapeneme, produkciju karbapenemaza potrebno je potvrditi dodatnim testovima (28,29).

Jedan od prvih testova koji je korišćen za laboratorijsku potvrdu produkcije karbapenemaza je modifikovani Hodge-test, koji se bazira na detekciji difundabilnih karbapenemaza disk difuzionom metodom. Test se ne može uvek lako interpretirati, njegova specifičnost i senzitivnost su nezadovoljavajući, te se ovaj test više ne preporučuje (28-30). Pokazano je da daje lažno pozitivne rezultate za izolate koji produkuju AmpC enzime, i da ne može detektovati NDM karbapenemze. NDM je lipoprotein vezan za spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija i ne difunduje u podlogu, za razliku od drugih tipova karbapenemaza koje su solubilni enzimi u periplazmatskom prostoru (29-34).

Kombinacija diska (ili tablete) meropenema sa inhibitorom karbapenemaza (kombinovani disk test) može se koristiti za njihovu detekciju, standardnom disk difuzionom tehnikom, što zbog inkubacije zahteva 16-18 h do dobijanja rezultata. U testu se koriste odgovarajući inhibitori karbapenemaza koji su tip-specifični. Karbapenemaze Amblerove klase A inhibira boronična kiselina, klase B dipikolonična kiselina i EDTA, dok za OXA-48 karbapenemaze nije definisan specifičan inhibitor. Prema novim saznanjima, avibaktam inhibira OXA-48, ali za sada ne postoje kriterijumi za testiranje. Takođe, rezistencija visokog nivoa na temocilin može ukazivati na produkciju OXA-48 karbapenemaza, ali može biti i rezultat postojanja drugih mehanizama rezistencije. U preporučeni algoritam za detekciju karbapenemaza (Slika 6) uključen je i kloksacilin, koji inhibira AmpC beta-laktamaze, da bi se razlikovala rezistencija na karbapeneme udružena sa hiperprodukcijom AmpC i gubitkom porina od rezistencije nastale usled produkcije karbapenemaza (28,29).



Slika 6. Algoritam za detekciju karbapenemaza kombinovnom disk metodom. Preuzeto iz EUCAST 2017. (28), uz izmene.

Nordman i Poirel su 2012. godine razvili biohemijski (kolorimetrijski) test za brzu detekciju produkcije karbapenemaza, Carba-NP test. Metoda se bazira na razgradnji imipenema pod dejstvom karbapenemaza, pri čemu nastaju karboksilni derivati koji menjaju pH, a time i boju indikatora fenol-crveno u žuto (28-35). Pokazano je da se na ovaj način sa visokom osetljivošću (96,8%) i specifičnošću (100%) potvrđuju KPC i MBL tipovi karbapenemaza, ali da je osetljivost za OXA-48 tip niska (38,5%). Hiperekspresija AmpC beta-laktamaza može dati lažno pozitivne rezultate (30,31). Postoji nekoliko komercijalnih varijanti ovog testa, kojima se u roku od 30 min do 2 h detektuje produkcija karbapenemaza kod izolata enterobakterija (28,29).

Karbapenemaze se mogu potvrditi i metodom inaktivacije karbapenema, baziranoj na hidrolizi ovih antibiotika u suspenziji ispitivane bakterije. Inaktivacija se potvrđuje testiranjem osetljivosti *E. coli* ATCC 25922 na agens koji je bio izložen dejstvu bakterija. Ukoliko izolat proizvodi karbapenemaze, ispitivani karbapenem, obično meropenem, biće inaktivisan i neće inhibirati rast *E. coli*. Za dobijanje rezultata testiranja potrebno je oko 18 h (28,29). Nekoliko studija je pokazalo visoku senzitivnost (91-94%) i specifičnost (99-100%) ove metode, ali i ograničenje za detekciju OXA-48 enzima (31,32).

Primena MALDI-TOF masene spektrometrije (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) može doprineti brzom detekciji CPE. Metoda se bazira na određivanju masenog spektra suspenzije bakterija sa karbapenemom, nakon inkubacije. Ukoliko ispitivani izolat proizvodi karbapenemaze i hidrolizuje karbapenem, jedan od pikova masenog spektra koji je specifičan za karbapenem se smanjuje ili gubi (28,29). Metoda nije standardizovana, ali je u brojnim studijama pokazana senzitivnost od 77%-100% i specifičnost od 94%-100% (32). Korelacija sa rezultatima molekularnog određivanja karbapenemaza je 98%, osim za OXA-48 tip enzima za koji je, kao i kod ostalih fenotipskih metoda, značajno manja (77%) (28,32,33).

Lateralni protočni esej je imunohromatografska metoda bazirana na monoklonskim antitelima specifičnim za određeni tip karbapenemaza (jedan ili više). Antitela se nalaze na nitroceluloznoj membrani i vezuju specifične epitope odgovarajuće karbapenemaze (28,29). Ova vrsta testova obezbeđuje rezultate za 15 minuta, ima specifičnost 95-100%, i predstavlja dobru alternativu za brzu i tačnu detekciju karbapenemaza (32).

## 1.6.2. Molekularna detekcija karbapenemaza

Brza i pouzdana detekcija karbapenemaza izuzetno je važna za kontrolu infekcija, ali kao što je prethodno navedeno, fenotipski testovi zahtevaju 24-72 h za dobijanje rezultata. Takođe, ne mogu detektovati sve tipove karbapenemaza, a OXA-48 predstavlja poseban izazov. Sa druge strane, većina molekularnih metoda ciljano određuje gene, što zahteva poznavanje aktuelnih epidemioloških podataka o CPE za određeno geografsko područje (31). Molekularni testovi su skuplji od fenotipskih, složeniji, zahtevaju tehnički dobro obučeno osoblje, ali su brzi (rezultati su dostupni za par sati), pouzdani, imaju visoku senzitivnost i specifičnost (veću od 96%) (29,34). Skrining pacijenata baziran na molekularnim testovima može dovesti do značajne uštede, jer se u najkraćem roku razlikuju pacijenti kolonizovani sa CPE od onih koji to nisu, te se preporuke za kontrolu infekcija primenjuju samo u potrebnoj meri (34).

Najčešće korišćena molekularna metoda je reakcija lančanog umnožavanja (engl. *Polimerase Chain Reaction*, PCR), kojom se može detektovati jedan određeni tip gena za karbapenemaze (engl. *Single PCR*), ili pak više gena (engl. *Multiplex PCR*) kod ispitivanog bakterijskog izolata. Specifičnost se postiže primenom odgovarajućih prajmera. Pored brojnih *in house* protokola, postoje mnogi komercijalni testovi, obično za klinički najrelevantnije i globalno najrasprostranjenije tipove karbapenemaza: KPC, VIM, IMP, NDM i OXA-48. Na ovaj način se brzo (za 2-4 h) i pouzdano utvrđuje prisustvo ovih gena. Specifičnost molekularnih testova je visoka, do 100%, kao i senzitivnost od 96-99,6% (30,31,35-37). Neki od najsavremenijih automatizovanih dijagnostičkih sistema obezbeđuju rezultate za manje od 1 h uz minimalnu manipulaciju uzorkom (priprema uzorka za nekoliko minuta) (37).

Poseban tip testova jeste PCR u realnom vremenu (engl. *Real-time PCR*, qPCR) kojim se direktno u uzorku može utvrditi prisustvo gena za karbapenemaze. Ova metoda se najčešće koristi za uzorke rektalnog brisa u cilju skrininga pacijenata kolonizovanih CPE, ili iz pozitivnih hemokultura radi što bržeg izbora optimalne terapije. Primenljiva je i na kulturi bakterija izolovanih iz različitih uzoraka (29,31,34). Rezultati qPCR testova se dobijaju istog dana, za razliku od skrininga baziranog na kulturi, čime se mogu značajno umanjiti troškovi lečenja (34).

Prethodno navedene molekularne metode podrazumevaju detekciju poznatih markera rezistencije. Međutim, imajući u vidu izraženu sposobnost bakterija da stiču nove alele gena rezistencije, koje uspešno međusobno razmenjuju mobilnim genskim elementima (plazmidima, integronima, transpozonima) (38), izuzetno je važna detekcija novih varijanti gena. Najnovija molekularna tehnika - sekvenciranje genoma nove generacije (engl. *Next generation sequencing*, NGS) omogućava detekciju i novih alela, npr. sekvenciranjem celog genoma (engl. *Whole genome sequencing*, WGS). Otkrivanje novih mutacija, uključujući i mutacije na nivou pojedinačnog nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism*, SNP), najbolje se postiže poređenjem sa prethodno sekvenciranim referentnim genomom (35). Na ovaj način se obezbeđuje rano prepoznavanje pretećih MDR sojeva bakterija, koji ne bi bili otkriveni testovima koji se primenjuju u rutinskom radu.

### 1.7. Mehanizmi rezistencije enterobakterija na kolistin

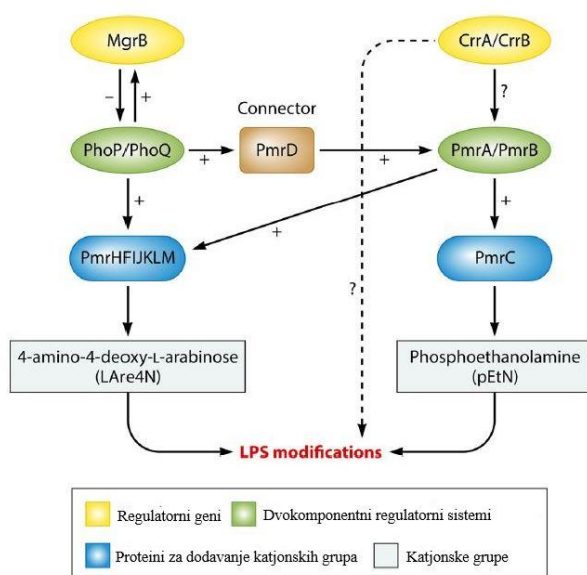
Kolistin spada u polimiksinske antibiotike, prirodne supstance koje proizvodi bakterija *Paenibacillus polymyxa*. To su hidrofilni, ciklični, katjonski peptidi, slični antimikrobnim peptidima eukariotskih ćelija (npr. defenzinima) (39).

Od pet klasa polimiksina, za kliničku primenu najznačajniji su polimiksin B i polimiksin E, odnosno kolistin. Ciljno mesto delovanja ovih antibiotika je ćelijska membrana Gram-negativnih bakterija. Kolistin reaguje sa fosfatnim grupama lipida A, zamenjujući  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  jone, što dovodi do destabilizacije lipopolisaharida, gubitka integriteta ćelijske membrane i smrti bakterijske ćelije. Drugi važan mehanizam dejstva jeste vezivanje za LPS, odnosno endotoksin, oslobođen nakon lize Gram-negativnih bakterija, čime neutrališe njegov efekat (39).

Kolistin deluje na većinu enterobakterija: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp. i dr. Međutim, značajan broj rodova i vrsta pokazuje urođenu rezistenciju: *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *S. marcescens*, *Campylobacter* spp. (39).

Najčešći mehanizam stečene rezistencije na kolistin kod enterobakterija je izmena ciljnog mesta, odnosno lipida A. Dodavanje fosfoetanolamina (engl. *Phosphoethanolamine*, pEtN) ili 4-amino-4-deoksi-L-arabinoze (L-Ara-4N) delu molekula lipida A koji se nalazi na površini ćelijske membrane umanjuje negativno naelektrisanje ovog molekula i onemogućava vezivanje pozitivno naelektrisanog kolistina. Geni za enzime uključene u sintezu lipida A i opisane enzimske modifikacije nalaze se na *pmrHFIJKLM* i *pmrCAB* operonu. U regulaciju su takođe uključeni i *pmrAB*, *phoPQ* i *mgrB* geni (Slika 7). Mutacije ovih hromozomskih gena rezultuju modifikacijom lipida A i rezistencijom na kolistin (39-42).

Nekoliko studija opisalo je i ulogu efluks pumpi (*AcrAB* i *KpnEF*) i hiperprodukcije kapsule kod *K. pneumoniae* u rezistenciji na polimiksine. Otpuštanje anjonskih kapsularnih polisaharida sa površine ćelije dovodi do „zarobljavanja“ katjonskih antimikrobnih peptida, kao što je kolistin, i smanjuje količinu antibiotika koja dospeva do ciljnog mesta (39-42).



Slika 7. Regulacija modifikacije lipopolisaharida kod *Klebsiella pneumoniae*.  
Preuzeto iz Poirel L et al. 2017. (39), uz izmene.

Krajem 2015. godine otkriven je novi, plazmidski gen, *mcr-1* (43). Produkt ovog gena pripada porodici fosfoetanolamin transferaza koje modifikuju lipid A, slično izmenama nastalim nakon mutacija hromozomskih gena. Ovaj mehanizam, iako nije najčešći, daleko je najznačajniji zbog lokalizacije gena odgovornih za rezistenciju na plazmidu i mogućnosti horizontalnog genskog transfera (40,44).

Gen *mcr-1* je prvobitno detektovan na plazmidu pHNSHP45 kod bakterija izolovanih iz uzoraka životinjskog porekla u Kini, i to kod *E. coli* i *K. pneumoniae* (43). Nalazi se na genskom lokusu nazvanom „*mcr-1* kasete“ od 2.600 bp, sa sopstvenim promotorom (39). Novije studije su utvrdile postojanje i drugih tipova plazmida nosilaca *mcr-1* gena: IncHI2, IncP, IncFIP i IncX4 (45,46). Neki od ovih plazmida (npr. IncHI2) su nosioci gena rezistencije i na druge klase antibiotika: beta-laktamske antibiotike (ESBL i geni za karbapenemaze), aminoglikozide, fluorohinolone, fosfomicin, tetracikline (39,45). Do danas, okarakterisano je 9 varijanti *mcr* gena (*mcr-1* do *mcr-9*) sa većim brojem podvarijanti (47).

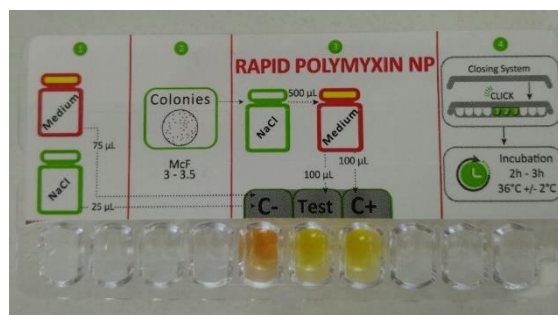
## 1.8. Laboratorijska detekcija osetljivosti na kolistin

### 1.8.1. Fenotipske metode za utvrđivanje osetljivosti na kolistin

Dobijanje pouzdanih i reproducibilnih rezultata testiranja osetljivosti na kolistin je ključno, s obzirom na to da ovaj antibiotik danas često predstavlja poslednju terapijsku opciju za MDR enterobakterije. Do pre par godina, ispitivanje osetljivosti je rađeno standardnim laboratorijskim metodama: disk difuzijom, testom gradijenta koncentracije ili u automatizovanim sistemima. Međutim, najnovija istraživanja su pokazala veliku diskrepancu između rezultata testiranja ovim metodama u odnosu na referentnu metodu - bujon mikrodiluciju (BMD) (39,48). Odstupanja su povezana sa karakteristikama molekula kolistina, kao što je katjonsko naelektrisanje, koje utiče na aktivnost antibiotika pri testiranju u medijumima sa neodgovarajućim koncentracijama katjona, stoga se preporučuje korišćenje podloga adaptiranog sastava. Drugi faktor je veličina molekula, koja otežava ravnomernu difuziju u čvrste podloge, što dovodi do lažne osetljivosti na ovaj lek u visokom procentu (oko 35%). Česta je i pojava heterorezistencije testiranih izolata, što utiče na interpretaciju rezultata (39).

Preporučena metoda za fenotipsko ispitivanje osetljivosti je BMD (49). Suspenzija ispitivanog bakterijskog izolata izlaže se delovanju različitih koncentracija antibiotika (0,12-512 µg/ml), u odgovarajućem tečnom medijumu (Miler Hinton bujon prilagođenog katjonskog sastava) (39,49). Najmanja koncentracija antibiotika koja dovodi do potpune inhibicije rasta bakterija u medijumu predstavlja MIK za ispitivani antibiotik. Ova metoda je tehnički zahtevna za rutinski rad, stoga su razvijeni različiti komercijalni testovi bazirani na BMD. Ovi testovi pokazuju visok stepen slaganja dobijenih rezultata u odnosu na referentnu BMD metodu, jednostavni su za korišćenje, ne zahtevaju dodatnu opremu i tehničke veštine, i preporučuju se za rutinsku primenu u laboratorijama (48).

Često je u kliničkoj praksi od izuzetne važnosti brzo dobijanje rezultata, posebno kada se radi o životno ugrožavajućim infekcijama kao što je sepsa, a prethodno opisane metode zahtevaju inkubaciju od 16-24 h. U tu svrhu razvijen je *Rapid Polymyxin<sup>TM</sup> NP* test (ELITech Microbio, France), koji se bazira na detekciji rasta bakterija u prisustvu određene koncentracije kolistina u medijumu. Osetljivost enterobakterija na kolistin se dobija za oko 2 h (Slika 8). Moguće je i testiranje direktno iz uzoraka hemokultura, što zahteva oko 4 h do dobijanja rezultata (39).



Slika 8. *Rapid Polymyxin<sup>TM</sup> NP* test, kolistin rezistentan izolat.

### 1.8.2. Molekularne metode za utvrđivanje osetljivosti na kolistin

Pored opisanih fenotipskih metoda, osetljivost na kolistin se može uspešno utvrditi savremenim tehnikama molekularne dijagnostike.

Mehanizmi rezistencije na kolistin posredovani hromozomskim genima su kompleksni, i najbolje se detektuju metodama sekvenciranja genoma, kao što je NGS. Na ovaj način se utvrđuju mutacije do nivoa pojedinačnog nukleotida (SNP), ali njihov značaj zavisi direktno od ekspresije ovih gena i ne mora korelirati sa fenotipskim ispoljavanjem rezistencije, te se mora tumačiti u skladu sa rezultatima fenotipskog testiranja (39).

Za razliku od detekcije mutacija hromozomskih gena, utvrđivanje plazmidskog *mcr* gena uvek podrazumeva fenotipski smanjenu osetljivost ili rezistenciju na kolistin. Zbog epidemiološkog značaja prisustva *mcr* gena, brze procene rizika i nadzora nad širenjem kolistinske rezistencije, preporučuje se njihova detekcija samostalno ili u okviru postojećih panela za molekularnu dijagnostiku baziranih uglavnom na reakciji lančanog umnožavanja (PCR). Međutim, zbog pojave velikog broja varijanti *mcr* gena, primena metoda baziranih na NGS najznačajnija je za detaljnu analizu rezistencije na kolistin, odnosno za karakterizaciju plazmida nosioca i genomskog okruženja *mcr* gena, kao i za tipizaciju kolistin-rezistentnih sojeva (39,44).

### 1.9. Genotipizacija CPE

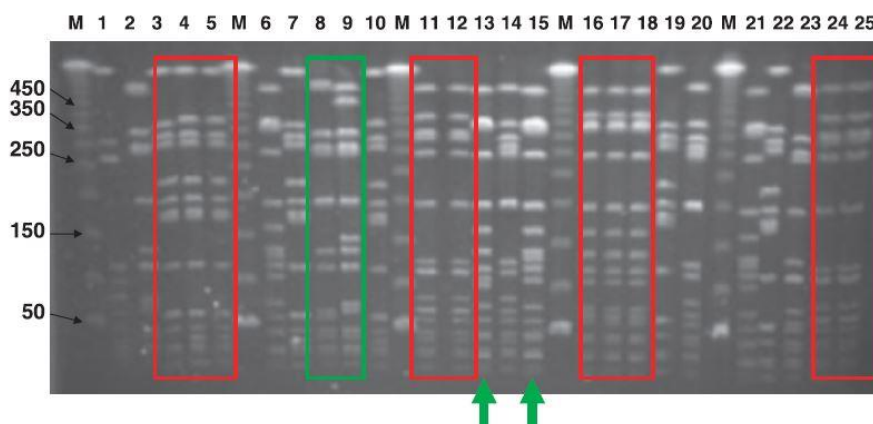
Uspešan nadzor nad širenjem multirezistentnih sojeva bakterija zavisi od brze i pouzdane detekcije međusobno povezanih klonova. Klonalna povezanost se utvrđuje primenom različitih metoda tipizacije bakterija. To mogu biti metode fenotipizacije (npr. serotipizacija, fagotipizacija, rezistotipizacija i dr.), ali one nisu uvek u korelaciji sa genetskim karakteristikama ispitivanog izolata, što otežava interpretaciju dobijenih rezultata. Zato su one danas zamenjene molekularnim metodama koje daju pouzdane i reproducibilne rezultate, uvid u populacionu strukturu i dinamiku mikroorganizama, i tako omogućavaju razvoj i unapređivanje mera za kontrolu infekcija i sprečavanja pojave epidemija (50,51).

Metode bazirane na analizi fragmenata dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) dobijenih različitim molekularnim tehnikama imaju značajnu ulogu u genotipizaciji enterobakterija. Tipizacija plazmida, koja podrazumeva utvrđivanje veličine, broja kopija i način fragmentacije nakon primene endonukleaza, najčešće se koristi za praćenje prenosa gena rezistencije.

Primena restrikcioni endonukleaza „*frequent cutter*” tipa rezultuje nastankom velikog broja (nekoliko stotina) kratkih fragmenata DNK. RFLP metodom (engl. *Restriction fragment length polymorphism*, RFLP), nakon gel elektroforeze fragmenata nastalih delovanjem

endonukleaza, dobija se specifičan profil čijim poređenjem se utvrđuje klonska povezanost između ispitivanih sojeva (50).

Slična metoda je i PFGE (engl. *Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE), kod koje se primenjuju endonukleaze „rare cutter” tipa, čime se DNK fragmentuje na duže segmente (20-600 kbp). Sledi gel elektroforeza sa periodičnim promenama pravca strujnog polja („*pulsed field*”). Dobijeni PFGE profil se dalje analizira ili vizuelno, što je primenljivo za manji broj ispitivanih izolata, ili se koriste različiti kompjuterski programi koji mogu analizirati veliki broj profila i značajno olakšati interpretaciju rezultata (Slika 9) (50).



Slika 9. PFGE analiza. M, marker molekularne težine fragmenata. 1-25, bakterijski izolati.

Crveno su uokvireni identični profili, zeleno profili koji se razlikuju u 2 pozicije.

Preuzeto iz van Belkum i sar., 2007. (50).

Za genotipizaciju enterobakterija koriste se i metode koje kao prvi korak imaju amplifikaciju određenih segmenata DNK. To mogu biti nasumični segmenti umnoženi kratkim, nespecifičnim prajmerima (manje od 10 bp) u RAPD metodi (engl. *Randomly amplified polymorphic DNA*, RAPD).

Kod REP-PCR metode (engl. *Repetitive intergenic palindromic PCR*, REP-PCR) odgovarajućim prajmerima se amplifikuju repetitivne sekvence nasumično razbacane u genomu bakterija. Tip i raspored repetitivnih sekvenci su karakteristični za vrstu, pa se tako za enterobakterije koriste ERIC prajmeri (engl. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR*, ERIC-PCR) (50).

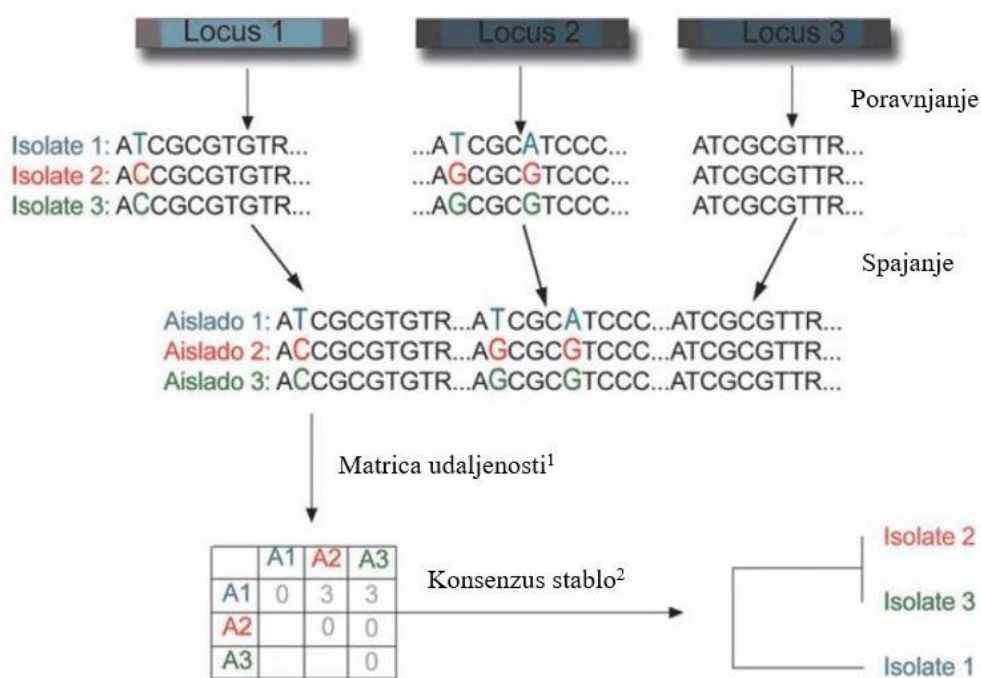
Kombinovanjem RFLP i PCR tehnika nastala je AFLP (engl. *Amplified fragment length polymorphism*, AFLP) metoda, u kojoj se umnožava deo fragmenata dobijenih RFLP metodom, čime se postiže veća reproducibilnost (50).

MLVA (engl. *Multi-locus VNTR analysis*) metoda se bazira na činjenici da u genomu bakterija postoje ponavljajuće DNK sekvence, čiji broj kopija varira (engl. *Variable Numbers of Tandem Repeats*, VNTR), čak i između srodnih sojeva. Ukoliko se radi o klonski povezanim sojevima, broj VNTR kopija je gotovo identičan, odnosno MLVA profil isti, što se može koristiti za populacionu analizu u slučaju epidemija (50).

Najsavremenije metode genotipizacije su metode sekvenciranja genoma. SLST (engl. *Single-locus sequence typing*, SLST) se bazira na sekvenciranju jednog gena koji mora pokazivati visok stepen varijabilnosti da bi se dobili validni podaci za tipizaciju (npr. *emm* gen *Streptococcus pyogenes*) (50). Retko se primenjuje kod enterobakterija, za razliku od MLST (engl. *Multi-locus sequence typing*, MLST). Ova metoda je danas široko prihvaćena, pre svega za istraživanje populacione genetike i dinamike bakterija, ali i za ispitivanje epidemija. MLST tehnikom sekvenciraju se konstitutivni, konzervirani, tzv. „housekeeping” geni, uglavnom sedam različitih vrsno-specifičnih gena odgovornih za metaboličke procese. Detekcijom

varijanti (alela) ovih sedam gena dobija se jedinstveni MLST profil ispitivanog izolata, tzv. tip sekvence (engl. *Sequence type*, ST) ili klon. Srodni ST čine klonalni kompleks (engl. *Clonal complex*, CC) (Slika 10) (50,51). Podaci dobijeni MLST tipizacijom su visoko reproducibilni i lako se upoređuju između laboratorija. Sistematizovani su u *on line* bazama podataka čijim pretraživanjem je omogućena interpretacija dobijenih rezultata (50,51). MLST metoda zahteva određeni stepen polimorfizma „housekeeping” gena, koji nije uvek dovoljno izražen da bi se ova metoda primenila (npr. kod *Mycobacterium tuberculosis*), ili je pak varijabilnost velika, što takođe nije pogodno za ovaj tip analize (50).

WGS ima najveću diskriminatornu moć i daje najvalidnije molekularno-epidemiološke podatke. Potpuno je automatizovana i omogućava istovremenu analizu velikog broja izolata. Primenom ove metode može se uočiti razlika u genomu na nivou jednog nukleotida (SNP). Rezultati sekvenciranja ispitivanog izolata upoređuju se sa referentnim genomom radi uočavanja varijabilnosti, određivanja filogenetske povezanosti i populacione dinamike na lokalnom i globalnom nivou. Pored SNP tipizacije, na ovaj način generisani podaci mogu se koristiti i za *in silico* MLST karakterizaciju, radi utvrđivanja klinički najrelevantnijih klonova i klonalnih kompleksa (50). Takođe, analiza determinanti antimikrobne rezistencije ili gena za faktore virulencije doprinosi razumevanju uspešnog širenja epidemijskih ili pandemijskih klonova (35).

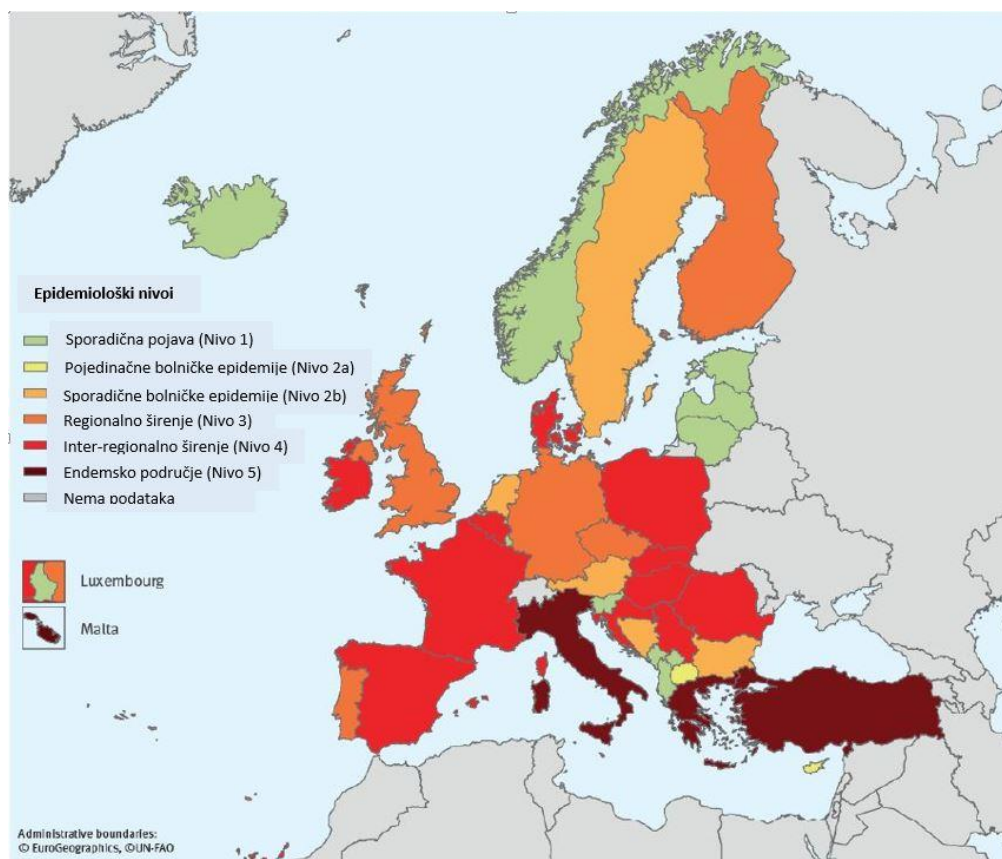


Slika 10. Shematski prikaz MLST analize bazirane na poravnanju i spajanju sekvenci. <sup>1</sup>Matrica udaljenosti na osnovu razlike između izolata na nivou nukleotida. <sup>2</sup>Konsenzus stablo dobijeno *neighbor-joining* ili UPGMA metodom. Preuzeto iz Persing i sar., 2016. (35), uz izmene.



## 1.10. Epidemiologija CPE

Dramatičan porast antimikrobne rezistencije kod enterobakterija poslednjih decenija i brzo širenje rezistentnih klonova na globalnom nivou predstavljaju jedan od glavnih izazova savremene medicine. Epidemiološke studije za utvrđivanje puteva širenja karbapenem-rezistentnih bakterija i distribuciju tipova karbapenemaza definisale su endemska područja za pet klinički najznačajnijih tipova karbapenemaza: KPC, NDM, VIM, IMP i OXA-48. Epidemiološka situacija CPE u Evropi 2019. prikazana je na Slici 11.



Slika 11. Epidemiološka situacija CPE u Evropi 2019.

*European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae –second update. Stockholm: ECDC; 2019., uz izmene.*

Radikalna promena globalne epidemiološke situacije dogodila se početkom 90-ih godina XX veka, kada su plazmidski kodirane karbapenemaze detektovane kod različitih vrsta kliničkih izolata enterobakterija, prvenstveno kod *K. pneumoniae*, i od tada se nezaustavljivo šire u svetu (52). Prvo veliko istraživanje, odnosno organizovani nadzor nad CPE u Evropi, sproveden je 2013. godine (*The European Survey on CPE, EuSCAPE*) (53). Ova studija je obuhvatila bolničke izolate *K. pneumoniae* i *E. coli* iz 455 bolnica u 36 evropskih zemalja. Rezultati su pokazali da je najveća incidencija CPE u Mediteranskim zemljama (Grčka, Italija, Crna Gora i Španija) i u Srbiji. U našoj zemlji najčešća karbapenemaza u ovoj studiji bila je NDM, što je i očekivano, jer se Balkansko poluostrvo smatra endemskim za ovaj tip enzima (54,55).

Narednih godina je u okviru EuSCAPE projekta nastavljeno praćenje CPE u Evropi, i 2018. godine su objavljeni rezultati za period od 2010-2018. godine. Do pogoršanja epidemiološke situacije došlo je u čak 11 zemalja, među kojima je i Srbija. Naša zemlja je od prvog epidemiološkog nivoa na kojem se nalazila do 2013. godine, sa sporadičnim javljanjem

CPE, 2018. godine dostigla četvrti epidemiološki nivo, sa potvrđenim inter-regionalnim širenjem CPE, odnosno sa višestrukim, povezanim epidemijama u različitim zdravstvenim ustanovama iz različitih regiona (56) (Slika 11).

### **1.11. CPE u vanbolničkoj populaciji**

Navedeni podaci o CPE odnose se na bolničke izolate, dok su podaci o stečenoj rezistenciji kod vanbolničkih bakterijskih izolata uglavnom nepoznati (2). Kelly i sar. su sistematskim pregledom dostupnih istraživanja utvrdili da se zastupljenost vanbolničkih CRE izolata kreće u širokom rasponu od 0,04% u Australiji, 5,6-10,8% u SAD, 18,2% u Španiji do 29,5% u Tajvanu, i istakli da je neophodan pojačan nadzor nad ovim bakterijama zbog njihove diseminacije u vanbolničkoj populaciji (57). U Belgijskoj multicentričnoj studiji učestalost CRE kod ambulantnih pacijenata iznosila je 1,9%, dok je učestalost CPE bila 0,6%, a najzastupljenija karbapenemaza OXA-48 (58).

Za sada nema dostupnih podataka o prisustvu CPE u vanbolničkoj populaciji u Srbiji, a organizovani epidemiološki nadzor nad vanbolničkim izolatima se ne sprovodi. Ukoliko se uzme u obzir činjenica da se Srbija nalazi na trećem mestu u Evropi po potrošnji antibiotika (59), i da se najveća potrošnja (80-90%) registruje u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, odnosno u vanbolničkoj populaciji, očekivano je širenje antimikrobne rezistencije u vanbolničkoj sredini u Srbiji zbog jasne veze između potrošnje antibiotika i pojave antimikrobne rezistencije (2,57,60).

### **1.12. Radna hipoteza**

Učestalost karbapenemaza-produkujućih izolata enterobakterija je manja u vanbolničkoj nego u bolničkoj populaciji, pri čemu se distribucija tipova karbapenemaza ne razlikuje značajno kod vanbolničkih i bolničkih izolata.

## ***2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

---

U skladu sa podacima iznetim u uvodu i postavljenoj radnoj hipotezi, definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Odrediti učestalost karbapenemaza-produkujućih izolata u reprezentativnom uzorku vanbolničkih izolata enterobakterija.
2. Utvrditi tipove karbapenemaza kod vanbolničkih izolata enterobakterija i odrediti njihovu klonalnu distribuciju i povezanost.
3. Ispitati osetljivost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija na kolistin i odrediti mehanizme stečene rezistencije kod kolistin-rezistentnih izolata.
4. Proceniti potrebu za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem karbapenemaza-produkujućih izolata enterobakterija u vanbolničkoj populaciji u Beogradu.

### ***3. MATERIЈAL I METODE***

---

### 3.1. Tip studije

Studija je sprovedena na reprezentativnom uzorku vanbolničke populacije po tipu studije preseka.

### 3.2. Mesto i period istraživanja

Istraživanje je rađeno u periodu od avgusta 2016. godine do januara 2020. godine, u Mikrobiološkoj laboratoriji Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum“, Beograd i Centru za mikrobiologiju Gradskog zavoda za javno zdravlje (GZJZ) Beograd. Ove ustanove obrađuju uzorke vanbolničke populacije na teritoriji Grada Beograda (populacija oko 1,6 miliona stanovnika). Godišnje analiziraju oko 180.000 (Zavod „Konzilijum“, Beograd), odnosno 255.000 (GZJZ, Beograd) uzoraka vanbolničkih pacijenata.

### 3.3. Bakterijski izolati uključeni u studiju

Istraživanje je obuhvatilo sve izolate enterobakterija izolovane primenom standardnih mikrobioloških metoda iz različitih uzoraka: urin, brisevi kože, brisevi površinskih rana, sputum, bris uha i bris oka. Za utvrđivanje učestalosti karbapenemaza-produkujućih enterobakterija rađen je skrining na produkciju karbapenemaza u okviru rutinskog testiranja osetljivosti na antimikrobne agense. Kriterijum za uključivanje u studiju bio je pozitivan skrining diskom meropenema od 10 µg (BioRad, Francuska) prema EUCAST preporukama (ZIR manji od 28 mm za meropenem, za izolate sa ZIR od 25-27 mm i rezistencija na piperacilin-tazobaktam, ZIR manji od 17 mm) (37). Izolati koji su imali pozitivan skrining uključeni su u dalje istraživanje na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu podataka iz literature o učestalosti karbapenemaza-produkujućih enterobakterija u vanbolničkoj (57) i bolničkoj populaciji (61), dovoljan broj jedinica posmatranja za ocenu proporcije je 316 za interval poverenja 95% i intervalnu ocenu preciznosti od 5%. Dovoljan broj jedinica posmatranja za testiranje razlike dve proporcije je 142 za nivo statističke značajnosti od 0,05 i statističku snagu od 0,80.

### 3.4. Identifikacija i čuvanje izolata

Izolati enterobakterija su identifikovani do nivoa vrste MALDI-TOF MS metodom (Vitek MS, bioMérieux, Francuska). Kultura ispitivanog izolata, kultivisanog u aerobnim uslovima 18-24 h na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi (bioMérieux, Francuska), naneta je sterilnom ezom u tankom, homogenom sloju na jedno polje pločice za analizu (VITEK® MS-DS SLIDE, bioMérieux, Francuska). Nakon sušenja na vazduhu, na polje je stavljan 1 µl rastvora matriksa (VITEK® MS-CHCA, bioMérieux, Francuska). U svakoj grupi od 16 ispitivanih izolata analiziran je kontrolni kalibracioni soj *E. coli* ATCC® 8739™, pod istim uslovima kao i ispitivani izolati.

Izolati su čuvani u triptikaza-soja bujonu (TSB, LabM Ltd., Velika Britanija) sa 12,5% sterilnim glicerolom na -70°C. Pre eksperimenta izolati su odmrznuti, presejani na krvni agar sa 5% ovčije krvi (bioMérieux, Francuska) i kultivisani u aerobnim uslovima 18-24 h na 37°C.

### 3.5. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti

Osetljivost na antimikrobne agense rađena je disk difuzionom metodom prema EUCAST metodologiji, određivanjem MIK u automatizovanom sistemu (Vitek 2, bioMérieux, Francuska) i bujon mikrodilucionom metodom za kolistin. Rezultati su interpretirani u skladu sa preporukama EUCAST standarda (49).

#### 3.5.1. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti disk difuzionom metodom

Antimikrobna osetljivost svih izolata uključenih u studiju ispitivana je disk difuzionom metodom po Kirby-Bauer-u, u skladu sa EUCAST preporukama (62) za sledeće antimikrobne agense: ampicilin (10 µg), amoksicilin/klavulanska kiselina (20/10 µg), ampicilin/sulbaktam (10/10 µg), piperacilin (30 µg), piperacilin/tazobaktam (30/6 µg), cefaleksin (30 µg), ceftriakson (30 µg), ceftazidim (10 µg), cefepim (30 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), levofloksacin (5 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg) i hloramfenikol (30 µg) (BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Osetljivost na antimikrobne agense testirana je na Mueller-Hinton agaru (MHE, bioMérieux, Francuska). Od čiste, sveže (18-24 h) kulture ispitivanog izolata u sterilnom rastvoru NaCl (API® NAACL 0.85% MED 2ML, bioMérieux, Francuska), pravljen je suspenzija gustine 0,5 po McFarland standardu, koja je određena denzitometrom (DEN-1, Biosan SIA, Litvanija). Suspenzija je nanošena sterilnim štapićem na površinu MHE podloge homogeno, u tri različita pravca, radi postizanja semikonfluentnog porasta. U roku od 15 min nanošeni su diskovi antimikrobnih agenasa. U narednih 15 min ploče su stavljane u inkubator, u aerobne uslove na 35°C+/-1°C. Nakon inkubacije od 16-20 h merene su ZIR za ispitivane antimikrobne agense i interpretirane prema EUCAST standardu kao S (osetljiv, standardni režim doziranja), I (osetljiv, povećana izloženost) ili R (rezistentan).

Za kontrolu kvaliteta disk difuzione metode korišćen je kontrolni soj *E. coli* ATCC® 25922™, pod istim uslovima kao i ispitivani izolati.

#### 3.5.2. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti u automatizovanom sistemu

Osetljivost na antibiotike je ispitana automatizovanim sistemom VITEK2 (bioMérieux, Francuska) pomoću kartica AST-GN76. AST kartice sadrže udubljenja sa supstratima za ispitivanje osetljivosti bakterija na 12 antibiotika (piperacilin-tazobaktam, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, ertapenem, imipenem, ciprofloksacin, levofloksacin, gentamicin, amikacin, trimetoprim-sulfametoksazol, tigeciklin), kao i za fenotipsku detekciju mehanizama rezistencije (ESBL). Od čiste, sveže (18-24 h) kulture ispitivanog izolata u sterilnom rastvoru NaCl (API® NAACL 0.85% MED 2ML, bioMérieux, Francuska), pravljen je suspenzija gustine 0,5 po McFarland standardu, koja je određena denzitometrom (VITEK Densichek, bioMérieux). Svaka test kartica je automatski napunjena bakterijskom suspenzijom i inkubirana tokom 8-12 h u VITEK aparatu. Tokom ovog perioda, svakih 15 minuta je automatski očitavano oslobađanje fluorescence koja nastaje kao posledica razgradnje supstrata usled rasta mikroorganizama u odgovarajućim udubljenjima kartice. Analiza podataka urađena je automatski pomoću VITEK 2 softvera.

Za kontrolu kvaliteta metode korišćen je kontrolni soj *E. coli* ATCC® 25922™, koji je analiziran pod istim uslovima kao i ispitivani izolati.

### 3.5.3. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti bujon mikrodilucijom

Osetljivost na kolistin određena je bujon mikrodilucionom metodom korišćenjem komercijalnog testa ComASP™ Colistin (Liofilchem®, Italija) prema uputstvu proizvođača. Test panel se sastoji od 8 bunarčića. Prvi bunarčić ne sadrži antibiotik, i predstavlja kontrolu rasta. Ostalih sedam sadrže dehidrisanu antimikrobnu supstancu (kolistin) u dvostrukim razblaženjima od 0,25 µg/ml do 16 µg/ml.

Od čiste, sveže (18-24 h) kulture ispitivanog izolata u sterilnom rastvoru NaCl (API® NACL 0.85% MED 2ML, bioMérieux, Francuska) pravljen je suspenzija gustine 0,5 po McFarland standardu, koja je određena denzitometrom (DEN-1, Biosan SIA, Litvanija). U roku od 15 min od ove suspenzije pravljen je razblaženje 1:20 u sterilnom rastvoru NaCl (rastvor A). 0,4 ml rastvora A dodavano je u 3,6 ml Mueller Hinton II bujona (Liofilchem®, Italija) (rastvor B). U svaki bunarčić sipano je po 100 µl rastvora B. Panel je inkubiran u aerobnim uslovima na 36±2°C 16-20 h.

Nakon isteka perioda inkubacije vizuelno je očitavan MIK za kolistin ispitivanog izolata, kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa koja inhibira vidljiv porast bakterija (zamućenje ili talog na dnu bunarčića).

Za kontrolu kvaliteta metode kao negativna kontrola korišćen je kontrolni soj *E. coli* ATCC® 25922™, a kao pozitivna kontrola kolistin rezistentni izolat *K. pneumoniae* (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LT635643>) (63).

### 3.6. Detekcija gena za karbapenemaze

Kod izolata sa pozitivnim skriningom na karbapenemaze rađen je *multiplex* PCR za 5 gena: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> i *bla*<sub>IMP</sub>.

#### 3.6.1. Ekstrakcija nukleinske kiseline

Celokupna ćelijska DNK ekstrahovana je komercijalnim kitom QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Obuhvatala je sledeće korake:

- jedna eza sveže kulture (18-24 h) ispitivanog izolata sa krvnog agara resuspendovana je u 180 µl QIAGEN ATL pufera iz komercijalnog seta u mini epruveti od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), uz vorteksovanje;
- u prethodnu suspenziju dodavano je 20 µl QIAGEN proteinaze K. Nakon vorteksovanja smeša je inkubirana na 56°C 10 min uz stalno mešanje (Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Nemačka);
- u sledećem koraku dodavano je 200 µl etanola (96-100%). Sledilo je vorteksovanje tokom 15 s i kratko centrifugiranje radi spiranja sadržaja sa zidova epruvete;
- u QIAamp Mini spin kolonu, postavljenu u kolekcionu tubu od 2 ml, sipan je celokupni sadržaj iz epruvete. Dobro zatvorena kolona centrifugirana je na 8.000 rpm tokom 1 min. Nakon centrifugiranja kolekciona tuba je menjana novom;
- u narednom koraku u kolonu je dodavano 500 µl QIAGEN AW1 pufera. Dobro zatvorena kolona centrifugirana je na 8.000 rpm tokom 1 min. Nakon centrifugiranja kolekciona tuba je menjana novom;
- sledilo je dodavanje 500 µl QIAGEN AW2 pufera. Dobro zatvorena kolona centrifugirana je na 14.000 rpm tokom 3 min;
- nakon centrifugiranja kolona je postavljana u novu mini epruvetu od 1,5 ml, i na sredinu membrane kolone dodavano je 50 µl QIAGEN AE pufera. Nakon inkubacije od 1 min na sobnoj temperaturi (22-25°C), epruvete sa kolonama su centrifugirane na 14.000 rpm tokom 1 min;



- mini epruvete sa filtratom (ekstrahovana DNK u QIAGEN AE puferu) zamrzavane su na -20°C i čuvane do korišćenja.

### 3.6.2. Multiplex PCR gena za karbapenemaze

Detekcija *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> i *bla*<sub>IMP</sub> gena rađena je korišćenjem prajmera navedenih u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za detekciju gena za karbapenemaze.

Gen		Nukleotidna sekvenca prajmera	Veličina produkta (bp)	Referenca
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	F <sup>a</sup>	5'-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3'	893	(64)
	R <sup>b</sup>	5'-TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3'		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	F	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'	390	(65)
	R	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	F	5'-GGGCAGTCGCTTCCAACGGT-3'	476	(66)
	R	5'-GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT-3'		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3'	188	(65)
	R	5'-CCAAACCACTACGTTATCT-3'		
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	F	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'	744	(67)
	R	5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3'		

<sup>a</sup>F-forward; <sup>b</sup>R-reverse.

PCR reakcija odvijala se u smeši zapremine 25 µl. Svaka smeša je sadržala:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka);
- po 0,4 µl svakog prajmera (*forward* i *reverse*) koncentracije 25 µM/ml (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD);
- 3 µl izolovane DNK ispitivanog izolata;
- 5,5 µl vode (RNase-Free Water, QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

Veličina produkta (bp)

PCR reakcija odvijala se u termobloku PCR termosajklera „Applied Biosystems ProFlex PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), pod uslovima navedenim u Tabeli 4.

Tabela 4. Parametri *multiplex* PCR reakcije.

	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95°C	15 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	
Vezivanje prajmera	59°C	60 s	30
Elongacija	72°C	60 s	
Završna elongacija	72°C	10 min	1

Za kontrolu kvaliteta metode korišćena je DNK izolata enterobakterija sa dokazanim genima za karbapenemaze kao pozitivna kontrola, a kao negativna kontrola u PCR smešu je umesto DNK dodavana voda (radi detekcije eventualne kontaminacije). Navedene kontrole su analizirane pod istim uslovima kao i ispitivani izolati.

### 3.6.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Vizuelizacija PCR produkata rađena je horizontalnom elektroforezom u 2% agaroznom gelu (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). U rastopljeni gel dodavana je interkalirajuća boja 1% etidijum bromid (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 0,1%. Kao pufer za elektroforezu korišćen je TAE pufer (Tris-acetate EDTA, TAE).

U bunarčice gela stavljano je 5 µl PCR produkta pomešanog sa 2 µl pufera za punjenje 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za proveru veličine fragmenata DNK korišćen je DNK marker 25-700 bp (GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Elektroforeza je rađena u strujnom polju jačine 175 V u trajanju od 20 min.

PCR produkti su vizuelizovani prosvetljavanjem UV svetlošću (280-320 nm) u UV transiluminatoru (BlueCube 300, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), i fotografisani za dokumentaciju GelView Software (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) programom.

### 3.7. Molekularna tipizacija

Tipizacija izolata rađena je ERIC-PCR metodom prema modifikovanom protokolu Versalovic i sar. (68). Za umnožavanje repetitivnih sekvenci karakterističnih za enterobakterije korišćena je DNK izolata ekstrahovana na prethodno opisan način (3.6.1.), sa prajmerima navedenim u Tabeli 5.

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za ERIC-PCR tipizaciju.

Prajmer	Nukleotidna sekvenca	Referenca
ERIC-1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	(68)
ERIC-2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	

#### 3.7.1. ERIC-PCR

ERIC-PCR reakcija odvijala se u smeši zapremine 25 µl. Svaka smeša je sadržala:

- 12,5 µl Qiagen TaqPCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka);
- po 0,4 µl prajmera ERIC-1R i ERIC-2, koncentracije 25 µM/ml (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD);
- 3 µl izolovane DNK ispitivanog izolata;
- 8,7 µl vode (RNase-Free Water, QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

Umnožavanje se odvijalo u termobloku PCR termosajklera „Applied Biosystems ProFlex PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), pod uslovima navedenim u Tabeli 6.

Tabela 6. Parametri ERIC-PCR reakcije.

	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95°C	10 min	1
Denaturacija	94°C	1 min	
Vezivanje prajmera	54°C	2 min	35
Elongacija	72°C	4 min	
Završna elongacija	72°C	10 min	1

### 3.7.2. Elektroforeza u agaroznom gelu

Razdvajanje ERIC-PCR produkata rađeno je horizontalnom elektroforezom u 1% agaroznom gelu (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). U rastopljeni gel dodavana je interkalirajuća boja 1% etidijum bromid (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 0,1%. Kao pufer za elektroforezu korišćen je TAE pufer (Tris-acetete EDTA, TAE).

U bunarčiće gela stavljano je 5 µl PCR produkta pomešanog sa 2 µl pufera za punjenje 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za proveru veličine fragmenata DNK korišćen je DNK marker 100-5000 bp (High Ladder O'GeneRuler Express DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Elektroforeza je rađena u strujnom polju jačine 175 V u trajanju od 45 min.

ERIC-PCR profili su vizuelizovani prosvetljavanjem UV svetlošću (280-320 nm) u UV transiluminatoru (BlueCube 300, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), i fotografisani za dokumentaciju GelView Software (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) programom.

### 3.7.3. Analiza ERIC-PCR profila

Fotografije ERIC-PCR profila u gelu analizirane su automatizovano. Korišćeni su GelJ (verzija 2.0) (69) i BioNumerics (verzija 7.6, Applied Maths, Ghent, Belgija) programi. U oba slučaja analiza je uključivala odgovarajući marker za normalizaciju (High Ladder O'GeneRuler Express DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), da bi se obezbedilo adekvatno pozicioniranje traka radi poređenja različitih ERIC-PCR profila. Sličnost između izolata određivana je Pirsonovim koeficijentom korelacije, a utvrđivanje klonalne povezanosti i distribucije je analizirano metodom prosečne udaljenosti između grupa (UPGMA). Finalni rezultati su grafički prikazivani u vidu odgovarajućeg filogenetskog stabla (dendrograma). Izolati sa ≥90% sličnosti smatrali su se klonski povezanim (70).

### 3.8. Utvrđivanje mehanizama rezistencije na kolistin

Kod kolistin-rezistentnih karbapenemaza-pozitivnih izolata enterobakterija utvrđivani su mehanizmi stečene rezistencije na kolistin MALDI-TOF MS analizom lipida A i sekvenciranjem celog genoma (WGS).

### 3.8.1. MALDI-TOF MS analiza lipida A

Ekstrakcija lipida A rađena je po protokolu Kocsis i sar. (71). Ukratko, 10 kolonija sveže bakterijske kulture (18-24 h) sa MHE agara (bioMérieux, Francuska) sterilnom ezom je rastvoreno u 1 ml 0,1 M vodenog rastvora limunske kiseline. Nakon vorteksovanja, smeša je inkubirana 90 min na 100°C. Nakon hlađenja, smeša je centrifugirana na 5.000 rpm 5 min. Sediment je korišćen za dalju analizu.

Priprema uzorka za MS analizu obuhvatala je resuspendovanje 10 µl sedimenta (ekstrahovani lipid A) u 10 µl 0,1 M vodenog rastvora limunske kiseline. Sledila je sonifikacija tokom 10 min, a potom izdvajanje soli korišćenjem jonoizmenjivačkih smola (Dowex™ 50WX8-200, Lennetech, Holandija).

Na jedno polje pločice za analizu (VITEK® MS-DS SLIDE, bioMérieux, Francuska) stavljano je 0,7 µl pripremljenog ekstrakta lipida A. Nakon sušenja na vazduhu, na polje je stavljano 0,7 µl rastvora matriksa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Uzorci su analizirani na VITEK MS aparatu (bioMérieux, Francuska), u modu sa negativnim jonima.

### 3.8.2. Ekstrakcija DNK za WGS

Celokupna ćelijska DNK ekstrahovana je komercijalnim kitom *DNeasy UltraClean Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača:

- 1,8 ml tečne kulture u kolekcionalnoj tubi od 2 ml centrifugirano je tokom 30 s na 5.000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta centrifugiranje je ponovljeno pod istim uslovima;
- sediment je resuspendovan u 300 µl QIAGEN PowerBead rastvora, uz vorteksovanje. Nakon vorteksovanja smeša je prebačena u QIAGEN PowerBead tubicu;
- u sledećem koraku dodavano je 50 µl QIAGEN SL rastvora. Dobro zatvorena tubica vorteksovana je 10 min;
- sledilo je centrifugiranje na 5.000 rpm tokom 30 s. Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u novu kolekcionalnu tubicu od 2 ml, uz dodavanje 100 µl QIAGEN IRS rastvora. Smeša je nakon vorteksovanja od 5 s inkubirana na 4°C tokom 5 min;
- nakon centrifugiranja na 5.000 rpm tokom 1 min, supernatant je prebačen u novu kolekcionalnu tubicu od 2 ml, uz dodavanje 900 µl QIAGEN SB rastvora i kratko vorteksovanje od 5 s;
- 700 µl smeše je prebacivano QIAGEN MB Spin kolonu, koja je centrifugirana na 5.000 rpm tokom 30 s. U sledećem koraku u kolonu je dodavana preostala količina smeše, uz ponavljanje centrifugiranja;
- sledilo je dodavanje je 300 µl QIAGEN CB rastvora i centrifugiranje na 5.000 rpm tokom 30 s. Nakon odbacivanja taloga, kolona je centrifugirana na 5.000 rpm tokom 1 min. Potom je stavljana u novu kolekcionalnu tubicu od 2 ml;
- u sledećem koraku na sredinu membrane kolone dodavano je 50 µl QIAGEN EB, sledilo je centrifugiranje na 5.000 rpm 30 s;
- koncentracija i prinos DNK produkta (A260/280) određena je Qubit fluorometer aparatom (Thermo Fisher Scientific, SAD), a kvalitet proveren korišćenjem DS-11 FX + instrumenta (DeNovix, Wilmington, SAD);
- mini epruvete sa filtratom (ekstrahovana DNK u QIAGEN EB puferu) zamrzavane su na -20°C i čuvane do korišćenja.

### 3.8.3. WGS

Sekvenciranje celog genoma kolistin-rezistentnih izolata enterobakterija rađeno je NextSeq platformom (Illumina Inc., San Diego, SAD) u CeGaT GmbH, Nemačka. Fragmenti DNK veličine 2x150 bp (engl. *short reads*) dobijeni su prema protokolu Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, SAD). Kvalitet dobijenih sekvenci je proveravan FastQC alatkom (verzija 0.11.6), a *de novo* slaganje sekvenci SPAdes alatkom (verzija 3.10.1) (72).

Dodatno, jedan reprezentativni izolat je sekvenciran MinION sekvenatorom (ONT, Oxford, Velika Britanija). Fragmentacija i formiranje biblioteke rađeno je korišćenjem R9.5.1 protočnih ćelija, prema protokolu 1D *Genomic DNA by Ligation* (SQK-LSK 109) (ONT, Oxford, Velika Britanija). Rezultati dobijeni NextSeq platformom (*short reads*) i MinION sekvenatorom (engl. *long reads*) su kombinovani i slagani hibridnim pristupom korišćenjem Unicycler platforme (73).

### 3.8.4. Bioinformatička analiza

Analiza gena potencijalnih nosilaca rezistencije na kolistin (*mgrB*, *pmrA/B*, *phoP/Q*, *crrA/B*) rađena je u BLAST+ (verzija 2.7.1) programu. U obzir su uzimane mutacije koje dovode do izmena u aminokiselinskom sastavu. Kao referentni kolistin-osetljivi sojevi, za poređenje su korišćeni genomi iz iste klonalne grupe, odnosno tipa sekvence, dostupni u BLAST internet bazi, i to: CG258, ST101 i ST336 su upoređivani sa NJST258\_2 (*accession no.* NZ\_CP006918.1), BA33875 (NEWA00000000) i MGH-78578 (NC\_009648.1), navedenim redosledom. Predviđanje novih mutacija rađeno je *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) (verzija 1.1.3) bioinformatičkom alatkom.

MLST je rađena *in silico*, korišćenjem alatke <https://github.com/tseemann/mlst> i Pasterove baze podataka <https://bigsd.b.pasteur.fr/>.

Slaganje sekvenci (engl. *alignment*) za filogenetsku analizu rađeno je Parsnp alatkom (verzija 1.2) (74). Kao referentni soj korišćen je NTUH-K2044 (*accession no.* NC\_012731.1). Dodatno, za izolate *K. pneumoniae* čiji su genomi dostupni u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology information*, NCBI) bazi, urađena je MLST analiza, za koju je kao referentni genom korišćen Kp\_Goe\_121641 (*accession no.* NZ\_CP018735.1). Oni sojevi koji su imali tip sekvence koji je bio najčešći kod studijskih izolata, uključeni su u komparativnu filogenetsku analizu. Takođe, uključeno je i 28 kolistin-rezistentnih bolničkih izolata *K. pneumoniae* iz Srbije. Filogenetsko stablo dobijeno Parsnp alatkom vizuelno je obrađeno iTool alatkom (<http://itol.embl.de>) (75).

Detekcija i karakterizacija plazmida rađena je *in silico*, korišćenjem PlasmidFinder programa (76). Komparativna analiza plazmida rađena je pomoću BLAST *Ring Image Generator* i Easyfig aplikacija (77,78).

## 3.9. Procena potrebe za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem vanbolničkih CPE

U odnosu na rezultate učestalosti CPE u vanbolničkoj populaciji u Beogradu, urađena je procena potrebe za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem CPE izolata. Prema podacima iz literature, za učestalost od 0,3% ili veću u nekoj populaciji preporučuje se detekcija i praćenje CPE (79,80). Na osnovu rezultata skrininga na produkciju karbapenemaza, osetljivosti na karbapeneme i rezultata molekularne detekcije karbapenemaza, preporučene su odgovarajuće metode koje se mogu primeniti za ciljanu mikrobiološku detekciju CPE.

### 3.10. Statistička analiza

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću programskog paketa SPSS 25.0 (engl. *Statistical Package for the Social Sciences-SPSS for Windows* IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2017).

Podaci su analizirani metodama deskriptivne statistike i primenom testova za procenu značajnosti razlike:  $\chi^2$  testa, Fišerovog testa (Fisher exact test), Mann-Whitney U i Z testa. Numerička obeležja su prikazana u vidu srednjih vrednosti (aritmetička sredina), a atributivna obeležja u vidu frekvencija i procenata. Testiranje značajnosti razlike frekvencija atributivnih obeležja izvršeno je primenom  $\chi^2$  testa. Fišerov test je korišćen u vidu tablica kontigencije 2x2 za testiranje manjih uzoraka kada  $\chi^2$  test nije mogao da se primeni (kada je više od 20% obeležja imalo očekivane frekvencije <5). Za testiranje aritmetičke sredine jednog skupa (primenjen uslov: standardna devijacija  $\sigma$  nije poznata, uzorak veličine  $n \geq 30$ ) i testiranje jednakosti proporcija dva skupa primenjen je Z test.

Svi testovi su primenjeni sa intervalom poverenja CI 95%, i definisanim stepenom slobode (DF=1). Statistički značajnim su smatrane sve dobijene vrednosti nivoa značajnosti  $p < 0,05$ . Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

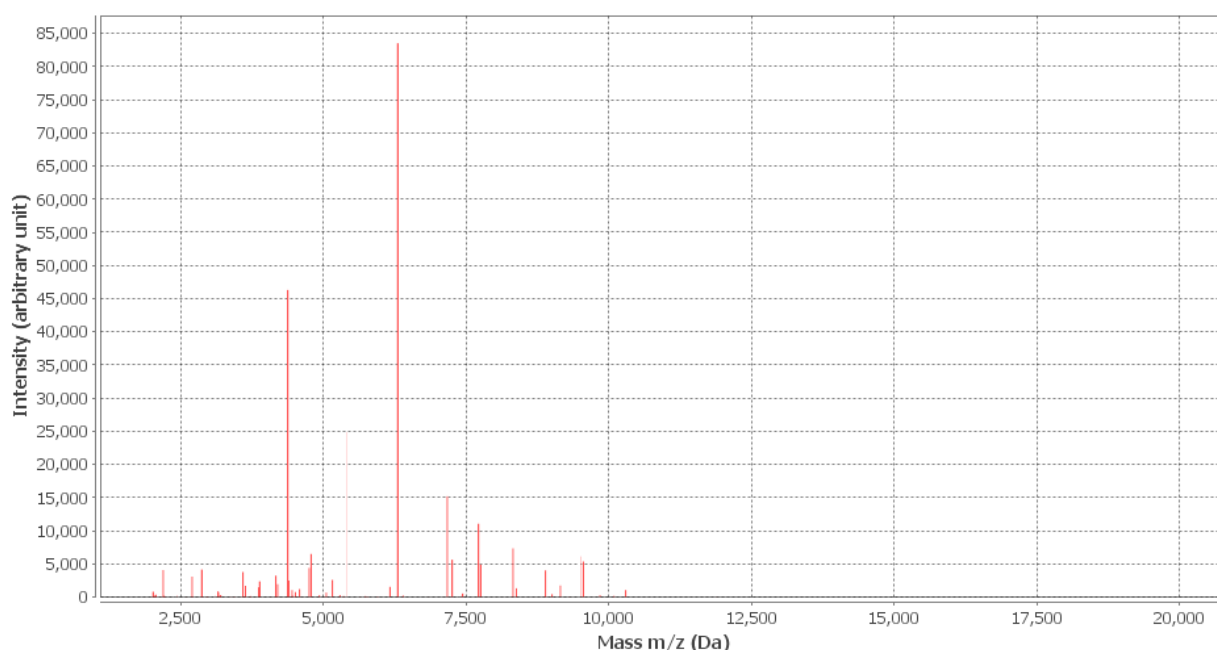
## ***4. REZULTATI***

---

#### 4.1. Bakterijski izolati uključeni u studiju

U periodu ispitivanja od avgusta 2016. do januara 2020. godine u Mikrobiološkoj laboratoriji Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum“, Beograd i Centru za mikrobiologiju Gradskog zavoda za javno zdravlje Beograd analizirano je ukupno 44.686 izolata enterobakterija. Od toga, u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum“ ispitano je 13.442 (30,1%), a u Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd 31.244 (69,9%) jedinstvenih izolata.

Svi izolati identifikovani su do nivoa vrste MALDI-TOF masenom spektrometrijom (Slika 12).



Slika 12. Primer MALDI-TOF masenog spektra *Klebsiella pneumoniae* (izolat br. 4).

Skrining na produkciju karbapenemaza bio je pozitivan kod 179 izolata sledećih vrsta enterobakterija: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae/asburiae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp. i *Serratia marcescens*. Ovim vrstama pripadalo je 42.508 (95,13%) izolata od ukupno analiziranih 44.686. Od 179 izolata uključenih u studiju, iz uzoraka urina bilo je 159 (88,8%) izolata, iz briseva površinskih rana 10 (5,6%), a iz ostalih uzoraka (sputum, bris uha, bris oka) još 10 (5,6%) izolata. Raspodela izolata sa pozitivnim skriningom po vrstama enterobakterija, u odnosu na ukupan broj analiziranih izolata iste vrste, prikazana je u Tabeli 7.



Tabela 7. Raspodela izolata sa pozitivnim skriningom na produkciju karbapenemaza po vrstama enterobakterija.

Vrsta	Ukupno izolata	Izolati sa pozitivnim skriningom, N (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4800	144 (3,00)
<i>Escherichia coli</i>	30783	3 (0,01)
<i>Enterobacter cloacae/asburiae</i>	1212	22 (1,80)
<i>Proteus mirabilis</i>	5372	2 (0,04)
<i>Providencia spp.</i>	240	5 (2,08)
<i>Serratia marcescens</i>	101	3 (2,97)
<b>Ukupno</b>	<b>42508</b>	<b>179 (0,40)</b>

Statistička analiza je pokazala da se pozitivan skrining na produkciju karbapenemaza značajno češće javlja kod *K. pneumoniae* u odnosu na *E. coli* ( $p<0,001$ ), *P. mirabilis* ( $p<0,001$ ) i *E. cloacae/asburiae* ( $p=0,023$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na vrste *Providencia spp.* ( $p=0,412$ ) i *S. marcescens* ( $p=0,986$ ).

#### 4.2. Prikaz rezultata detekcije gena za karbapenemaze kod vanbolničkih izolata enterobakterija sa pozitivnim skriningom na produkciju karbapenemaza

##### 4.2.1. Učestalost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija

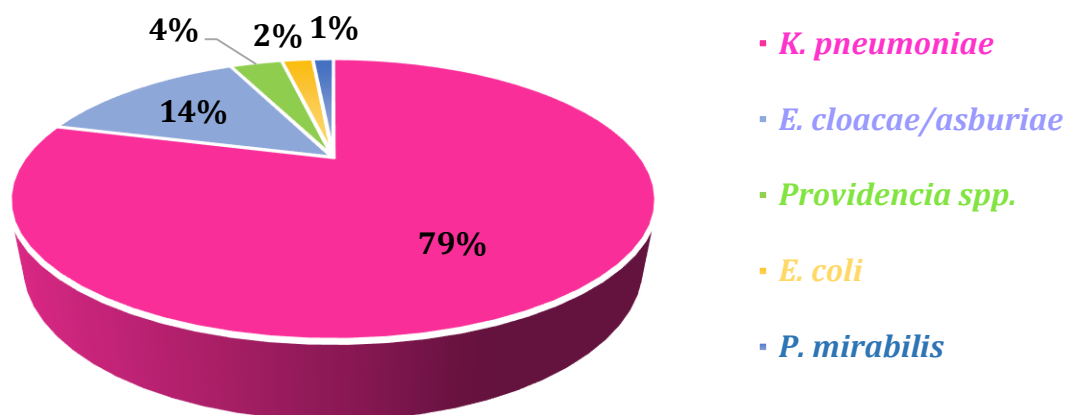
Geni za karbapenemaze su dokazani kod 144 (80,4%) od 179 izolata enterobakterija uključenih u studiju. Kod svih izolata *E. coli*, *P. mirabilis* i *Providencia spp.* je nakon pozitivnog skrininga utvrđeno i prisustvo gena za karbapenemaze. Najveći broj izolata kod kojih nakon pozitivnog skrininga nisu dokazani geni pripadao je vrsti *K. pneumoniae* (30 izolata), dva izolata su pripadala vrsti *E. cloacae/asburiae*, dok ni kod jednog od tri testirana izolata *S. marcescens* nisu potvrđeni geni. Raspodela izolata sa pozitivnim skriningom kod kojih su dokazani geni za karbapenemaze po vrstama enterobakterija prikazana je u Tabeli 8. Nije utvrđena statistički značajna razlika u detekciji karbapenemaza skriningom ili PCR metodom kod vrsta *K. pneumoniae* ( $p=0,387$ ) i *E. cloacae/asburiae* ( $p=0,335$ ). Statistička značajnost detekcije karbapenemaza skriningom/PCR metodom nije testirana kod ostalih vrsta zbog male učestalosti pozitivnih izolata ( $\leq 5$ ).

Najčešće izolovane vrste enterobakterija sa genima za produkciju karbapenemaza su bile *K. pneumoniae* (79,2%) i *E. cloacae/asburiae* (13,9%). Raspodela CPE izolata po vrstama enterobakterija prikazana je na Grafikonu 1. Utvrđena je statistički značajno veća učestalost produkcije karbapenemaza kod *K. pneumoniae* u odnosu na sve ostale vrste enterobakterija ( $p<0,001$ ).

U odnosu na ukupan broj analiziranih jedinstvenih izolata enterobakterija, učestalost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija na teritoriji Beograda iznosi 0,34% (95% CI 0,3-0,4%).

Tabela 8. Raspodela izolata sa pozitivnim skriningom kod kojih su dokazani geni za karbapenemaze po vrstama enterobakterija.

Vrsta	Izolati sa pozitivnim skriningom	Izolati sa dokazanim genima, N (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	144	114 (79,2)
<i>Enterobacter cloacae/asburiae</i>	22	20 (90,9)
<i>Providencia spp.</i>	5	5 (100)
<i>Escherichia coli</i>	3	3 (100)
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2 (100)
<i>Serratia marcescens</i>	3	0 (0)
<b>Ukupno</b>	<b>179</b>	<b>144 (80,4)</b>

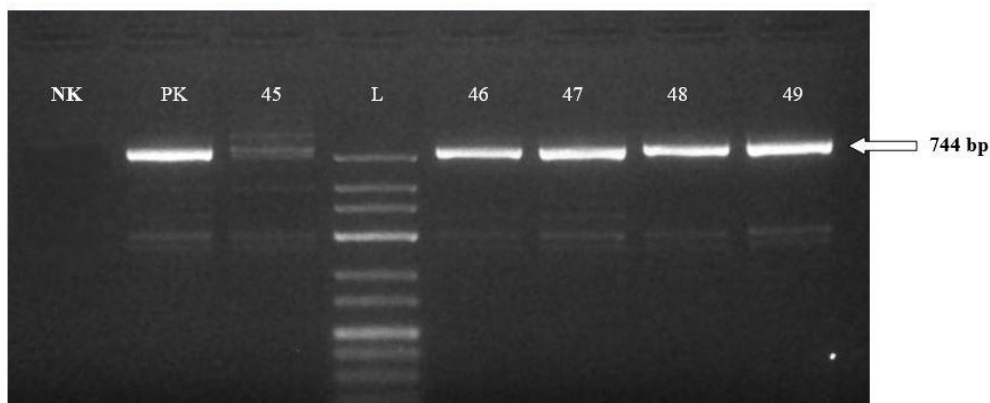


Grafikon 1. Raspodela CPE izolata po vrstama enterobakterija.

#### 4.2.2. Dokazivanje prisustva gena za karbapenemaze *multiplex* PCR metodom

Za sve izolate sa pozitivnim skriningom na produkciju karbapenemaza rađen je *multiplex* PCR za pet gena: *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* i *bla<sub>IMP</sub>*.

Kod 93 (64,6%) izolata utvrđeno je prisustvo produkta od 744 bp koji odgovara *bla<sub>OXA-48-like</sub>* genu (Slika 13).



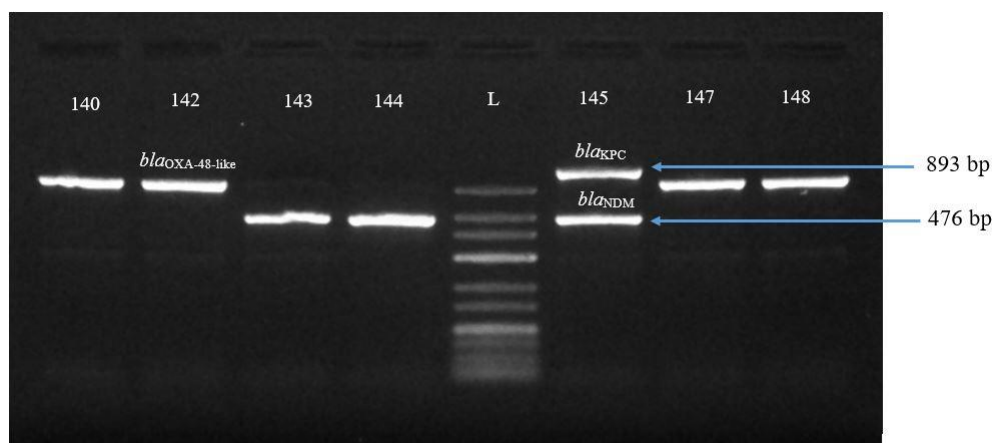
Slika 13. Gel elektroforeza *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena (pozitivni uzorci 46-49; negativan uzorak 45; PK-pozitivna kontrola; NK-negativna kontrola; L-DNK standard 100 bp).

Trideset (20,8%) izolata imalo je *bla*<sub>NDM</sub> gen detektovan gel elektroforezom kao produkt od 476 bp, dok je kod 10 (6,9%) izolata nakon PCR reakcije utvrđen produkt od 893 bp koji odgovara *bla*<sub>KPC</sub> genu (Slika 14).

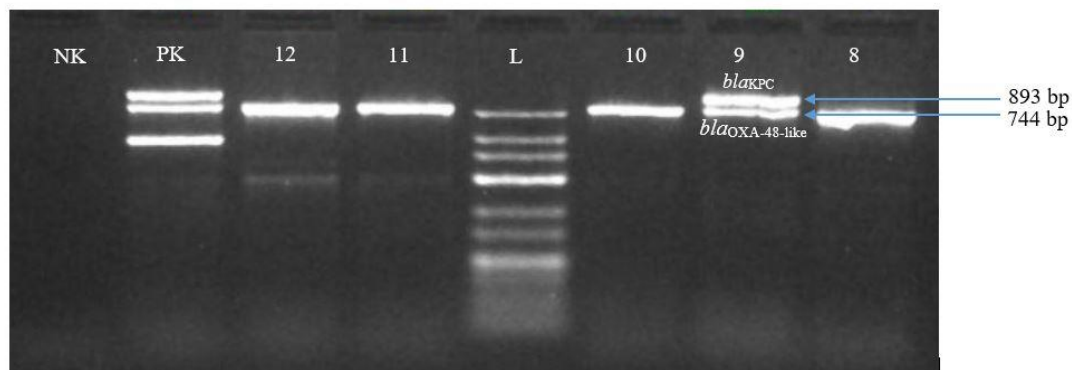
Kod osam (5,6%) izolata potvrđena su po dva gena, i to: jedan izolat (0,7%) *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>KPC</sub> geni (Slika 14), jedan izolat (0,7%) *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> geni (Slika 15), i kod šest (4,2%) izolata *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> geni (Slika 16).

Produkt veličine 390 bp, koji odgovara *bla*<sub>VIM</sub> genu imalo je tri (2,1%) izolata (Slika 16).

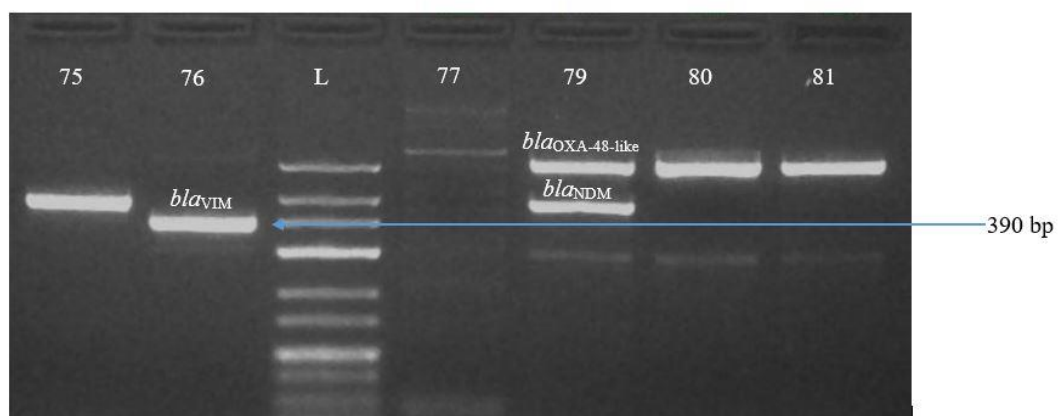
Produkt veličine 188 bp, koji odgovara *bla*<sub>IMP</sub> genu nije detektovan ni kod jednog izolata.



Slika 14. Gel elektroforeza: *bla*<sub>NDM</sub> pozitivan kod izolata 143-144; *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> pozitivni kod izolata 145; *bla*<sub>OXA-48-like</sub> kod izolata 140, 142, 147, 148; L-DNK standard 100 bp.



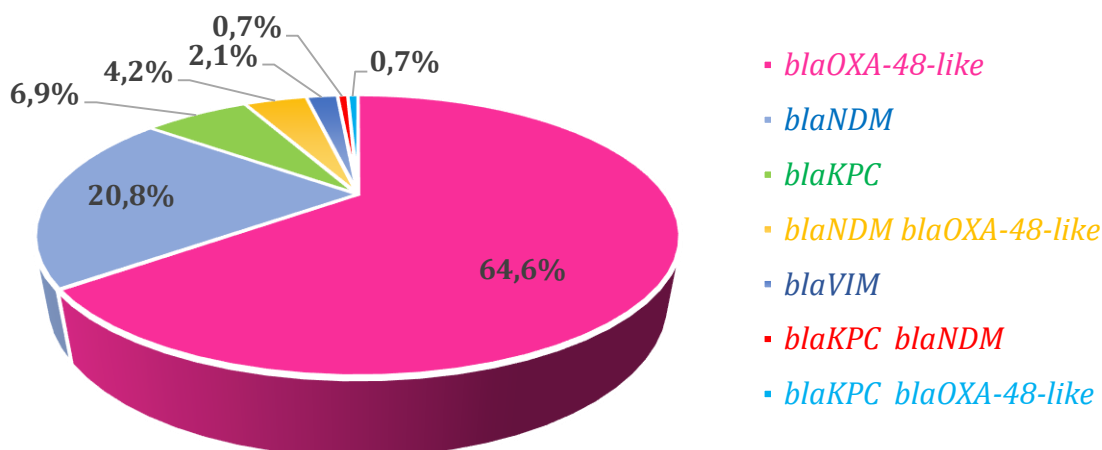
Slika 15. Gel elektroforeza: *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> geni pozitivni kod izolata 9; *bla*<sub>OXA-48-like</sub> kod izolata 8,10-12); PK-pozitivna kontrola; NK-negativna kontrola; L-DNK standard 100 bp.



Slika 16. Gel elektroforeza: *bla*<sub>VIM</sub> pozitivan kod izolata 76; *bla*<sub>OXA-48-like</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> pozitivni kod izolata 79; izolat 77 negativan; L-DNK standard 100 bp.

#### 4.2.3. Učestalost i distribucija gena za karbapenemaze

Najčešći gen za karbapenemaze bio je *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, detektovan kod 93 (64,6%) izolata, slede 30 (20,8%) *bla*<sub>NDM</sub>, 10 (6,9%) *bla*<sub>KPC</sub>, šest (4,2%) *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, tri (2,1%) *bla*<sub>VIM</sub>, i po jedan izolat sa *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub>, odnosno sa *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genima (Grafikon 2). Gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub> je detektovan sa statistički značajno većom učestalošću u odnosu na sve ostale gene za produkciju karbapenemaza ( $p < 0,001$ ).



Grafikon 2. Učestalost gena za karbapenemaze kod vanbolničkih CPE.

Najčešći gen za karbapenemaze kod *K. pneumoniae* bio je *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, detektovan kod 92 (80,7%) izolata, slede *bla*<sub>KPC</sub> kod 10 (8,8%) i *bla*<sub>NDM</sub> kod devet (7,9%) izolata. Po jedan izolat imao je *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, odnosno *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> gene. U odnosu na sve ostale gene, gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub> je detektovan sa statistički značajno većom učestalošću ( $p < 0,001$ ).

Kod 15 (75%) izolata *E. cloacae/asburiae* dokazan je *bla*<sub>NDM</sub> gen, kod četiri (20%) *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> geni, dok je jedan izolat imao *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Gen *bla*<sub>NDM</sub> je detektovan sa statistički značajno većom učestalošću u odnosu na sve ostale gene ( $p < 0,001$ ).

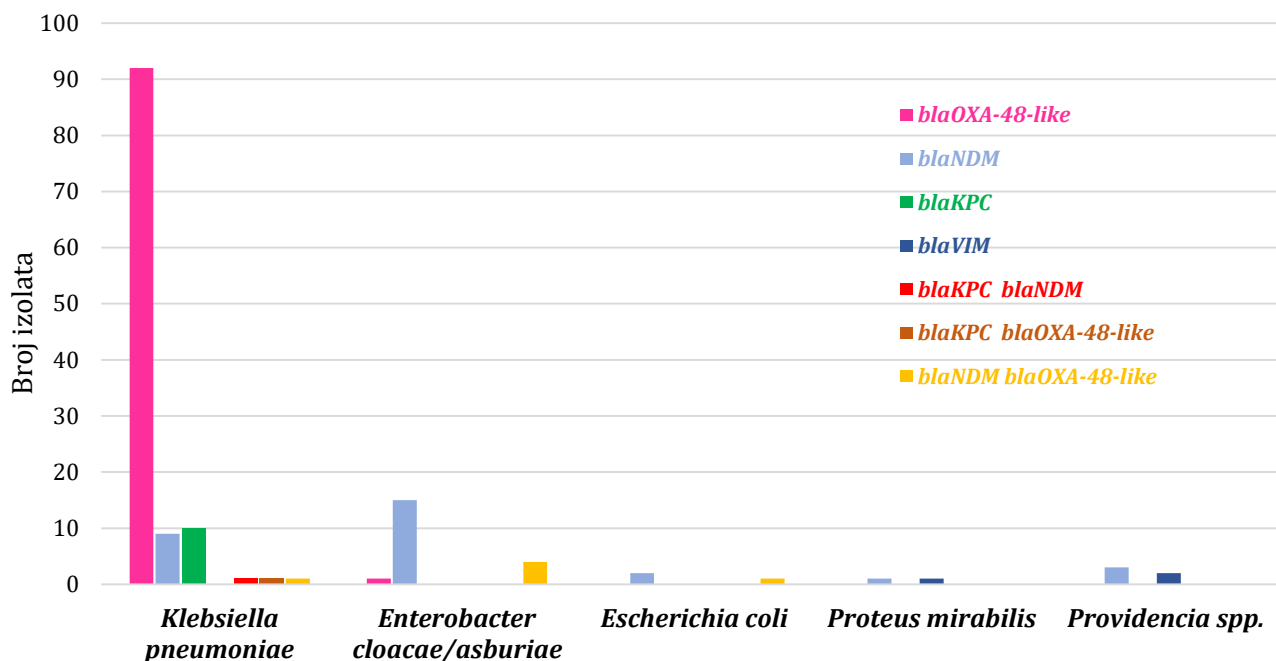
Dva (66,7%) izolata *E. coli* imala su *bla*<sub>NDM</sub> gen, a jedan (33,3%) izolat *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gene.

Od pet izolata *Providencia* spp. tri (60%) su imala *bla*<sub>NDM</sub> gen, a dva izolata (40%) *bla*<sub>VIM</sub> gen.

Gen *bla*<sub>VIM</sub> je potvrđen kod jednog (50%) izolata *P. mirabilis*, dok je kod drugog izolata detektovan *bla*<sub>NDM</sub> gen.

Statistička značajnost razlike u prisustvu gena za karbapenemaze kod *E. coli*, *Providencia* spp. i *P. mirabilis* nije testirana zbog male učestalosti izolata ( $\leq 5$ ).

Distribucija gena za karbapenemaze po vrstama enterobakterija prikazana je na Grafikonu 3.



Grafikon 3. Distribucija gena za karbapenemaze po vrstama enterobakterija.

U odnosu na vrstu enterobakterija i tip gena koji je detektovan kod određenih vrsta, utvrđena je statistički značajno veća učestalost:

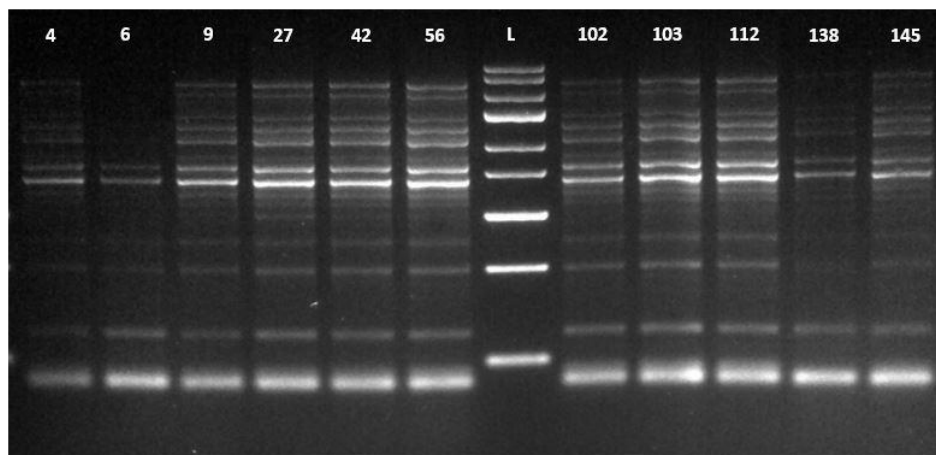
- *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena kod *K. pneumoniae* u odnosu na *E. cloacae/asburiae* ( $p < 0,001$ );
- *bla*<sub>KPC</sub> gena kod *K. pneumoniae* u odnosu na sve ostale vrste CPE ( $p < 0,001$ );
- *bla*<sub>NDM</sub> gena kod *K. pneumoniae* u odnosu na *E. coli* ( $p = 0,021$ ) i *P. mirabilis* ( $p = 0,006$ );
- *bla*<sub>NDM</sub> gena kod *E. cloacae/asburiae* u odnosu na *E. coli* ( $p < 0,001$ ), *P. mirabilis* ( $p < 0,001$ ) i *Providencia spp.* ( $p < 0,001$ );
- *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena istovremeno kod *E. cloacae/asburiae* u odnosu na sve ostale vrste CPE ( $p = 0,006$ ).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti:

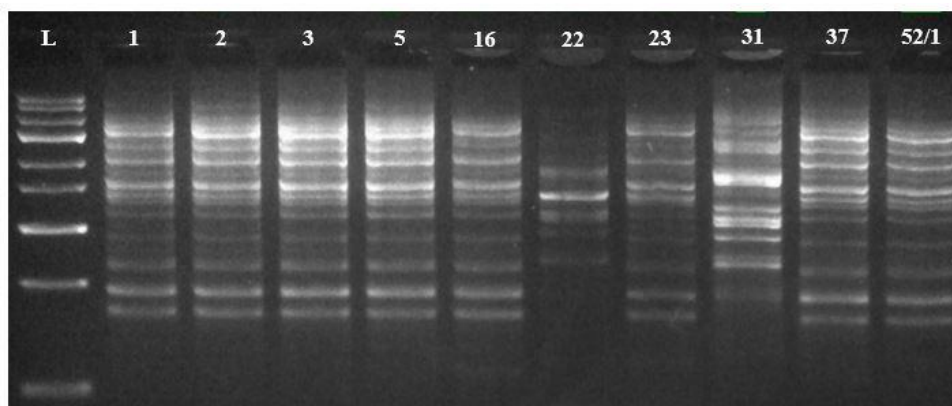
- *bla*<sub>NDM</sub> gena kod *K. pneumoniae* u odnosu na *E. cloacae/asburiae* ( $p = 0,118$ );
- *bla*<sub>NDM</sub> gena kod *K. pneumoniae* u odnosu na *Providencia spp.* ( $p = 0,056$ ).

#### 4.2.4. Genotipizacija karbapenemaza-produkujućih enterobakterija ERIC-PCR metodom

Utvrđivanje klonalne povezanosti i klonalne distribucije rađeno je ERIC-PCR metodom za 88 izolata *K. pneumoniae* i za 17 izolata *E. cloacae/asburiae*, kod kojih su dokazani geni za karbapenemaze (Slike 17 i 18).



Slika 17. Primer gel elektroforeze ERIC-PCR profila *Klebsiella pneumoniae* (izolati 4-145; L-DNK standard 100-5.000bp).



Slika 18. Primer gel elektroforeze ERIC-PCR profila *Enterobacter cloacae/asburiae* (izolati 1-52; L-DNK standard 100-5.000bp).

#### 4.2.5. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza rađena je za *K. pneumoniae* i *E. cloacae/asburiae*, dok za ostale vrste CPE nije rađena zbog malog broja izolata. ERIC-PCR profili analizirani su automatizovano korišćenjem GelJ (verzija 2.0) i BioNumerics (verzija 7.6, Applied Maths, Ghent, Belgija) programa. Izolati sa  $\geq 90\%$  sličnosti određene Pirsonovim koeficijentom korelacije smatrani su klonski povezanim i grupisani su u isti klaster. Klasteri su označeni brojevima.

Analizom 88 izolata *K. pneumoniae* identifikovano je 26 klastera (1-26). U 10 klastera koji su imali po četiri ili više izolata, svrstano je 70,46% ukupno testiranih izolata. Četvrtina izolata (25%) grupisana je u dva klastera, klastere 7 i 11. U odnosu na ova dva klastera, utvrđena je statistički značajno manja zastupljenost klastera sa tri ili manje izolata ( $p < 0,001$ ). Izraženu klonalnu povezanost pokazali su *bla*<sub>KPC</sub> pozitivni izolati *K. pneumoniae* (12,5% ukupnog broja), koji su svi svrstani u klaster 7. Drugi po zastupljenosti (12,5% ukupnog broja) bio je klaster 11, u kome se nalazi 11 klonalno povezanih *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivnih izolata. Broj izolata i raspodela gena po klasterima, kao i povezanost gena sa određenim klasterom, prikazani su u Tabeli 9. Klonalna povezanost i distribucija prikazana je dendrogramima (Slike 19-21).

Tabela 9. Broj izolata, raspodela gena i povezanost gena sa određenim ERIC-PCR klasterom *K. pneumoniae*.

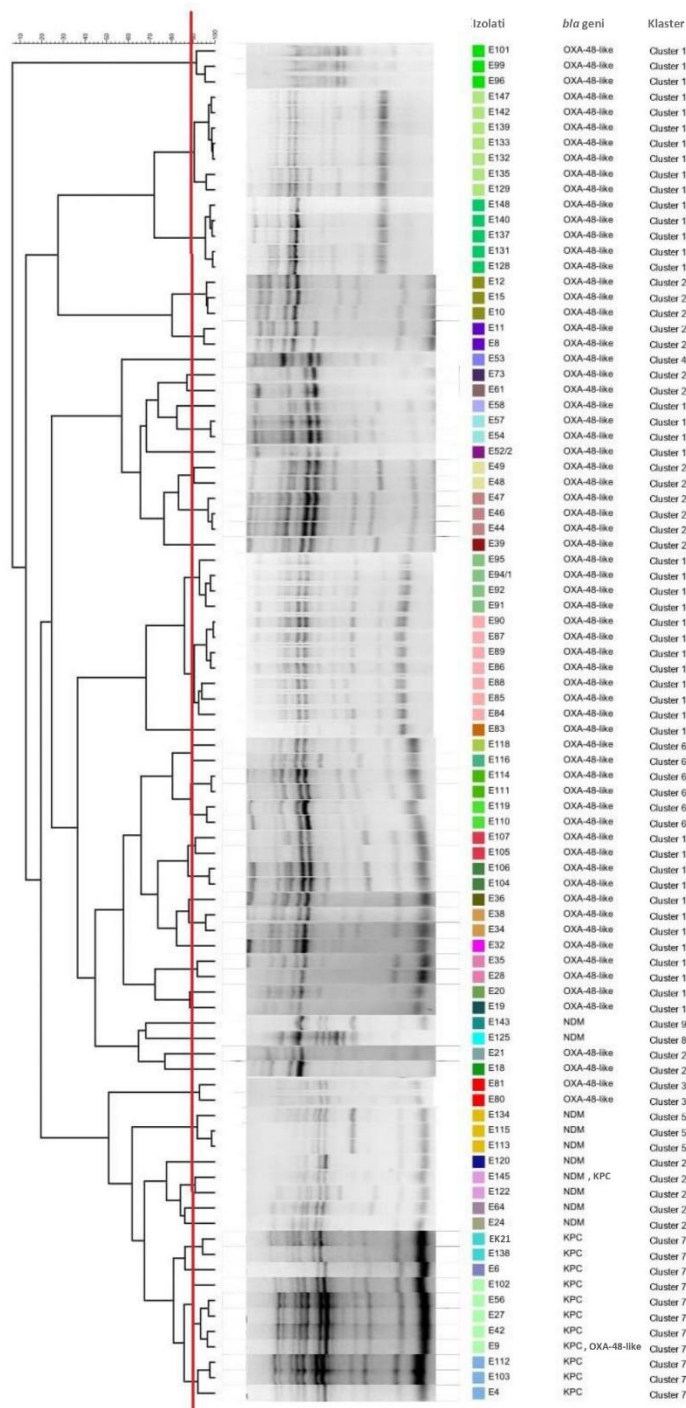
ERIC-PCR klaster	Broj izolata	%	Gen	p
7	11	12,50	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<0,001
5	3	3,41	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
8	1	1,14	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
9	1	1,14	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
25	4	4,55	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
26	1	1,14	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
1	3	3,41	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
2	5	5,68	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
3	2	2,27	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
4	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
6	6	6,82	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
10	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
11	11	12,50	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
12	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
13	5	5,68	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
14	7	7,95	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
15	2	2,27	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
16	2	2,27	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
17	4	4,55	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
18	4	4,55	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
19	3	3,41	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
20	2	2,27	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
21	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
22	5	5,68	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<0,05
23	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
24	1	1,14	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	
Ukupno	88	100		



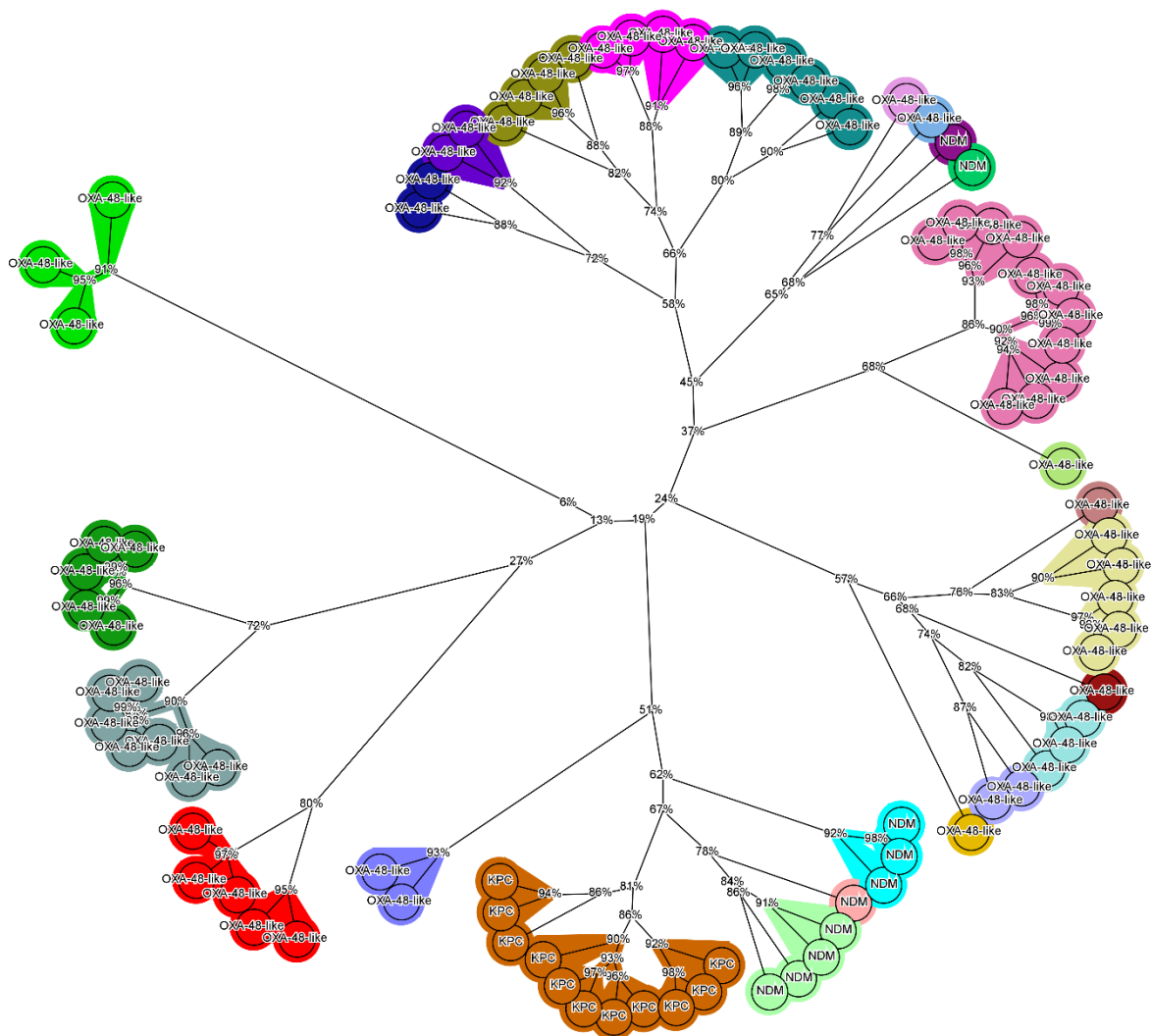
Izolati *E. cloacae/asburiae* grupisani su u šest klastera (1-6). Najveću učestalost imali su klasteri 5 (29,41%) i 6 (35,3%). Utvrđena je statistički značajna udruženost *bla<sub>NDM</sub>* gena sa klasterima 5 i 6 ( $p < 0,05$ ), kao i statistički značajna udruženost klastera 6 sa dva gena za karbapenemaze, *bla<sub>NDM</sub>* i *bla<sub>OXA-48-like</sub>* ( $p < 0,05$ ). Broj izolata, raspodela gena i povezanost gena sa određenim ERIC-PCR klasterom *E. cloacae/asburiae* prikazana je u Tabeli 10. Klonalna povezanost i distribucija izolata *E. cloacae/asburiae* prikazana je dendrogramima (Slike 22-23).

Tabela 10. Broj izolata, raspodela gena i povezanost gena sa određenim ERIC-PCR klasterom *E. cloacae/asburiae*.

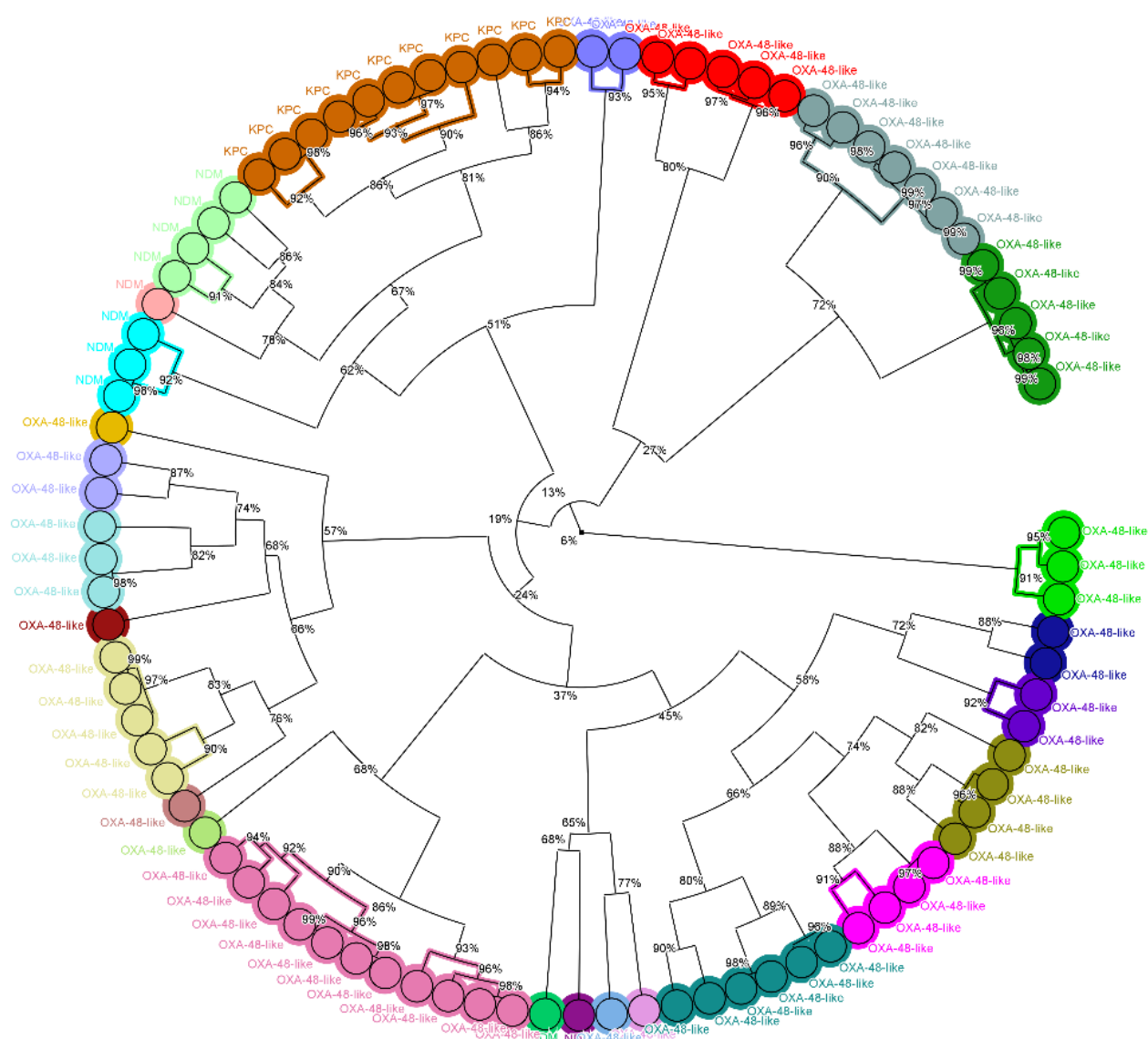
ERIC-PCR klaster	Broj izolata	%	Geni	p
1	2	17,65	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	
	1		<i>bla<sub>NDM</sub>, bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	
2	1	5,88	<i>bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	
3	1	5,88	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	
4	1	5,88	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	
5	4	29,41	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<0,05
	1		<i>bla<sub>NDM</sub> i bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	
6	4	35,30	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<0,05
	2		<i>bla<sub>NDM</sub>, bla<sub>OXA-48-like</sub></i>	
Ukupno	17	100		



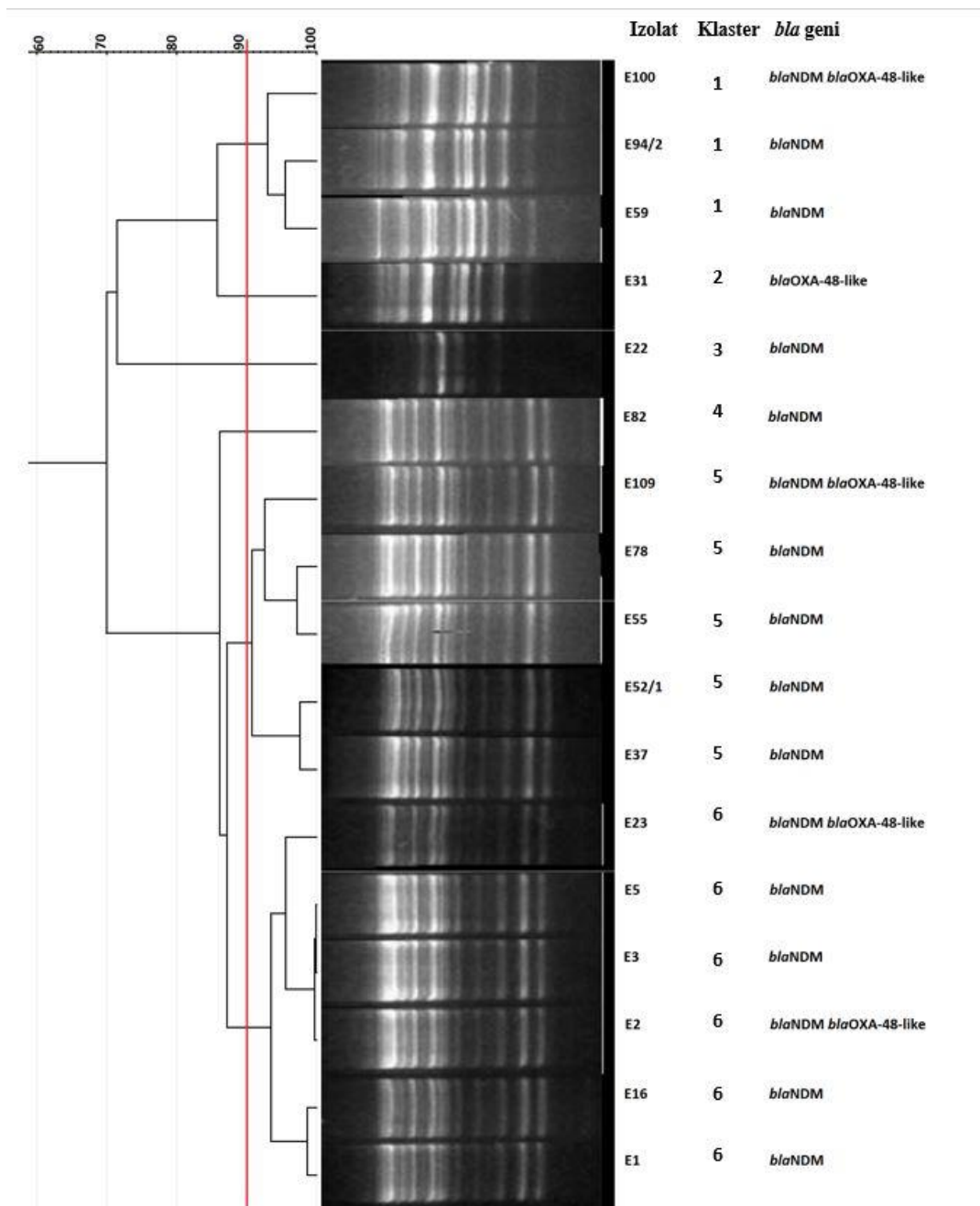
Slika 19. Dendrogram 88 izolata *Klebsiella pneumoniae* (UPGMA, GelJ v.2.0). Klaster čine izolati koji pokazuju  $\geq 90\%$  sličnosti (crvena linija) i označeni su brojevima 1-26.



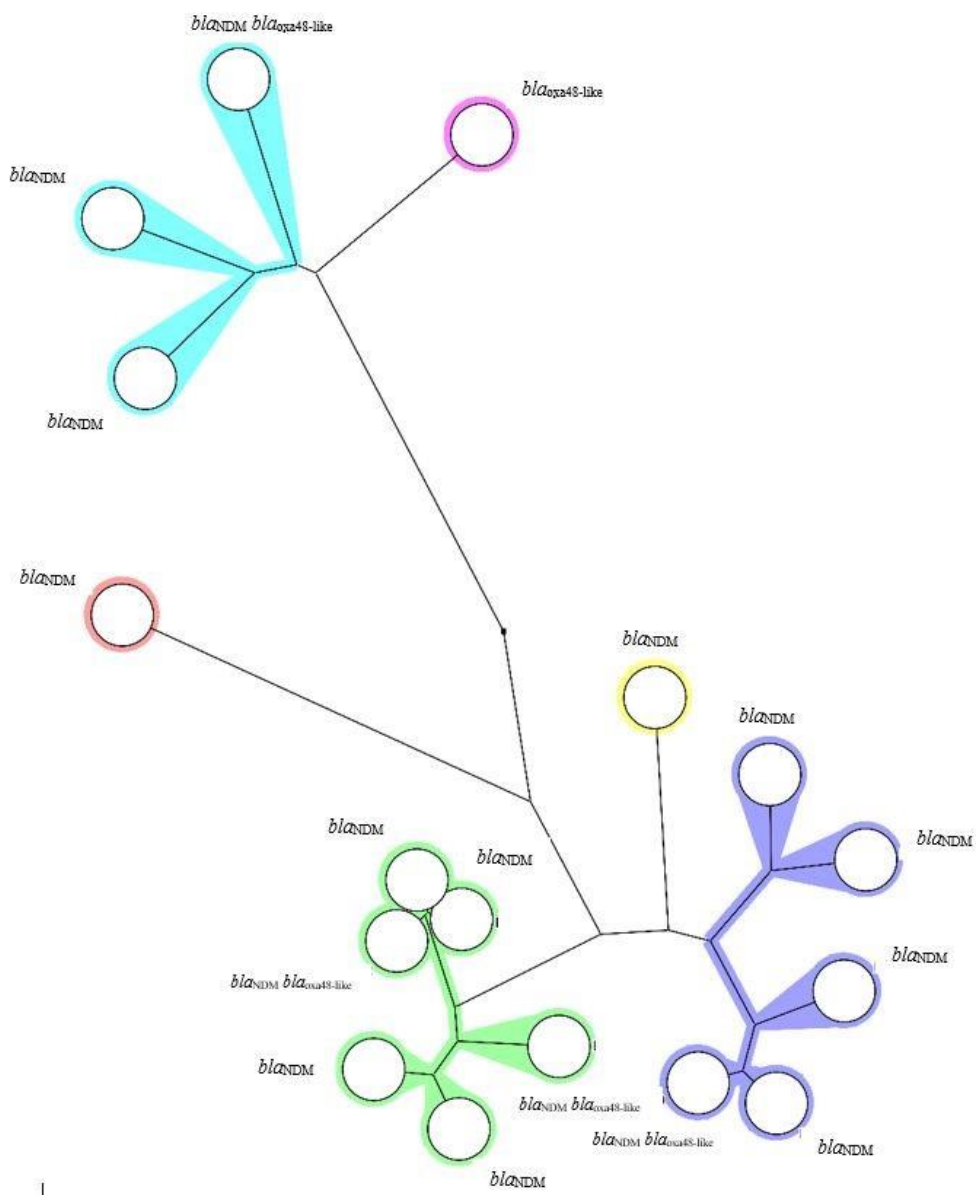
Slika 20. Dendrogram 88 izolata *Klebsiella pneumoniae* (UPGMA, BioNumerics v.7.6). Prikazana je distribucija gena za karbapenemaze po klasterima. Klaster čine izolati koji pokazuju  $\geq 90\%$  sličnosti (procenat sličnosti je označen na granama stabla).



Slika 21. Dendrogram 88 izolata *Klebsiella pneumoniae* (UPGMA, BioNumerics v.7.6). Prikazana je distribucija gena za karbapenemaze po klasterima. Klaster čine izolati koji pokazuju  $\geq 90\%$  sličnosti (procenat sličnosti je označen na granama stabla).



Slika 22. Dendrogram 17 izolata *Enterobacter cloacae/asburiae* (UPGMA, GelJ v.2.0). Klaster čine izolati koji pokazuju  $\geq 90\%$  sličnosti (crvena linija) i označeni su brojevima 1-6.



Slika 23. Dendrogram 17 izolata *Enterobacter cloacae/asburiae* (UPGMA, BioNumerics v.7.6). Prikazana je distribucija gena za karbapenemaze po klasterima.

### 4.3. Osetljivost na antibiotike

#### 4.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike disk difuzionom metodom

Za sve izolate uključene u studiju osetljivost na antibiotike testirana je disk difuzionom metodom za 19 antibiotika iz pet različitih kategorija: beta-laktami (penicilini, penicilini sa inhibitorom beta-laktamaza, cefalosporini, karbapenemi, aztreonam), fluorohinoloni, aminoglikozidi, kombinacija trimetoprima i sulfonamida i hloramfenikol. Svi testirani izolati pokazali su MDR fenotip, odnosno rezistenciju na bar jedan antibiotik iz tri ili više različitih kategorija. Osetljivost CPE na antibiotike prikazana je u Tabeli 11. Osetljivost na antibiotike vanbolničkih izolata enterobakterija kod kojih nisu dokazani geni za karbapenemaze prikazana je u Tabeli 12.

Tabela 11. Osetljivost na antibiotike vanbolničkih CPE određena disk difuzionom metodom.

Antibiotik	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilin	0	0	100
Amoksisilin-klavulanska kiselina	0	NP	100
Ampicilin-sulbaktam	0	NP	100
Piperacilin	0	0	100
Piperacilin-tazobaktam	0,7	0	99,3
Cefaleksin	0	NP	100
Ceftriakson	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Cefepim	0,7	0,7	98,6
Ertapenem	0	0	100
Imipenem	6,3	22,2	71,5
Meropenem	2,1	4,1	93,8
Aztreonam	4,2	0,7	95,1
Ciprofloksacin	0,7	0	99,3
Levofloksacin	0,7	0,7	98,6
Gentamicin	15,3	NP	84,7
Amikacin	31,9	NP	68,1
Trimetoprim-sulfametoksazol	2,1	0	97,9
Hloramfenikol	34,0	6,9	52,1

S-osetljiv, standardni režim doziranja; I-osetljiv, povećana izloženost; R-rezistentan; NP-nije primenljivo.

Tabela 12. Osetljivost na antibiotike vanbolničkih izolata enterobakterija kod kojih nisu dokazani geni za karbapenemaze određena disk difuzionom metodom.

Antibiotik	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilin	0	0	100
Amoksisicilin-klavulanska kiselina	0	NP	100
Ampicilin-sulbaktam	0	NP	100
Piperacilin	0	0	100
Piperacilin-tazobaktam	0	2,9	97,1
Cefaleksin	0	NP	100
Ceftriakson	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Cefepim	0	0	100
Ertapenem	20,0	5,7	74,3
Imipenem	14,3	5,7	80,0
Meropenem	22,9	11,4	65,7
Aztreonam	0	0	100
Ciprofloksacin	0	0	100
Levofloksacin	0	2,9	97,1
Gentamicin	11,4	NP	88,6
Amikacin	34,3	NP	65,7
Trimetoprim-sulfametoksazol	2,1	0	97,9
Hloramfenikol	37,1	8,6	54,3

S-osetljiv, standardni režim doziranja; I-osetljiv, povećana izloženost; R-rezistentan; NP-nije primenljivo.

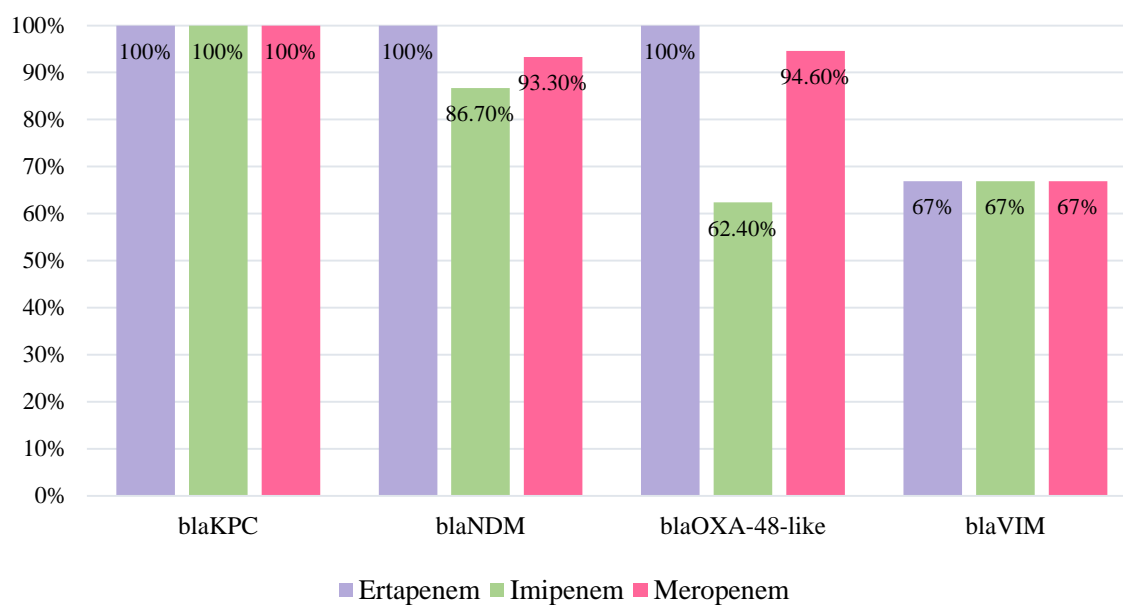
Osetljivost na karbapeneme se statistički značajno razlikovala između izolata sa dokazanim genima za karbapenemaze i izolata kod kojih nisu dokazani geni za karbapenemaze. Rezistenciju na ertapenem pokazalo je 100% izolata sa dokazanim genima za karbapenemaze, i 80% izolata kod kojih nisu dokazani geni ( $p < 0,001$ ), a na meropenem 93,8% izolata sa dokazanim genima za karbapenemaze i 65,7% izolata kod kojih nisu dokazani geni ( $p < 0,001$ ). Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u rezistenciji na imipenem između izolata sa dokazanim genima (71,5%) i izolata kod kojih nisu dokazani geni za karbapenemaze (80,0%) ( $p > 0,05$ ), kod izolata sa dokazanim genima za karbapenemaze je uočena statistički značajno veća učestalost detekcije I fenotipa osetljivosti u odnosu na izolate kod kojih nisu dokazani geni ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13). Dodatno, utvrđena je statistički značajno manja učestalost rezistencije na imipenem u odnosu na druge karbapeneme kod izolata sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom ( $p < 0,001$ ), kao i značajno manja učestalost rezistencije na imipenem u odnosu na ertapenem kod izolata sa *bla*<sub>NDM</sub> genom ( $p < 0,05$ ).



Tabela 13. Proporcija izolata rezistentnih na ertapenem, imipenem i meropenem među karbapenemaza pozitivnim i karbapenemaza negativnim izolatima.

Karbapenem	Udeo izolata sa rezistencijom na karbapeneme (%)		
	Karbapenemaza poz.	Karbapenemaza neg.	p
Ertapenem	100	80,0	<0,001
Imipenem	71,5	80,0	>0,05
Meropenem	93,8	65,7	<0,001

Proporcija izolata rezistentnih na karbapeneme u odnosu na tip gena za karbapenemaze prikazana je na Grafikonu 4.



Grafikon 4. Proporcija izolata rezistentnih na karbapeneme u odnosu na tip gena za karbapenemaze.

### 4.3.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike u automatizovanom sistemu

Za karbapenemaza-produkujuće izolate *E. cloacae/asburiae* u automatizovanom sistemu VITEK2 određeni su MIK za 12 antibiotika (AST-GN76 karticom): piperacilin-tazobaktam, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, ertapenem, imipenem, ciprofloksacin, levofloksacin, gentamicin, amikacin, trimetoprim-sulfametoksazol i tigeciklin. Rezultati su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. MIK antibiotika karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata *E. cloacae/asburiae* određeni bujon mikrodilucijom u automatizovanom sistemu.

Izolat	PIT <sup>a</sup>	CTR	CTZ	CEP	ERT	IMI	CIP	LEV	GEN	AMI	TRS	TIG
E 1	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=1
E 2	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=1
E 3	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=2
E 5	>64	>32	>32	>32	>4	>8	=2	=4	>8	>32	≤20	=2
E 16	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	=160	=1
E 22	>64	>32	>32	>32	>4	=8	>2	>4	>8	=4	>160	=2
E 23	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=2
E 31	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	=4	>160	=2
E 37	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=2
E 52/1	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	=4	>8	>32	>160	=2
E 55	>64	>32	>32	=32	=4	=8	>2	>4	>8	=4	>160	=2
E 59	>64	>32	>32	=32	>4	=8	>2	=4	>8	>32	>160	=2
E 78	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=2
E 82	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	=4	>8	>32	>160	=2
E 94/2	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	=4	>8	=8	>160	>4
E 100	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	=4	>160	=1
E 109	>64	>32	>32	>32	>4	>8	>2	>4	>8	>32	>160	=2

PIT, piperacilin-tazobaktam; CTR, ceftriakson; CTZ, ceftazidim; CEP, cefepim; ERT, ertapenem; IMI, imipenem; CIP, ciprofloksacin; LEV, levofloksacin; GEN, gentamicin; AMI, amikacin; TRS, trimetoprim-sulfametoksazol; TIG, tigeciklin;

Rezistentan (R); Osetljiv, povećana izloženost (I); Osetljiv, standardni režim doziranja (S);

Svi testirani izolati *E. cloacae/asburiae* bili su MDR, odnosno kod svih (100%) izolata utvrđena je rezistencija na piperacilin-tazobaktam, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, ertapenem, ciprofloksacin, levofloksacin i gentamicin. Utvrđena je visoka stopa rezistencije na trimetoprim-sulfametoksazol (94,1%) i amikacin (70,6%). S obzirom na to da za rod *Enterobacter* nema kliničkih graničnih vrednosti za interpretaciju vrednosti MIK za tigeciklin, primenjene su epidemiološke *cut-off* vrednosti (ECOFF 2,0 mg/l). Kod većine izolata (94,1%) nije utvrđena stečena rezistencija na tigeciklin, odnosno pripadaju „wild type”. Osetljivost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata *E. cloacae/asburiae* na antibiotike prikazana je u Tabeli 15.

Tabela 15. Osetljivost karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata *E. cloacae/asburiae* na antibiotike određena bujon mikrodilucijom u automatizovanom sistemu.

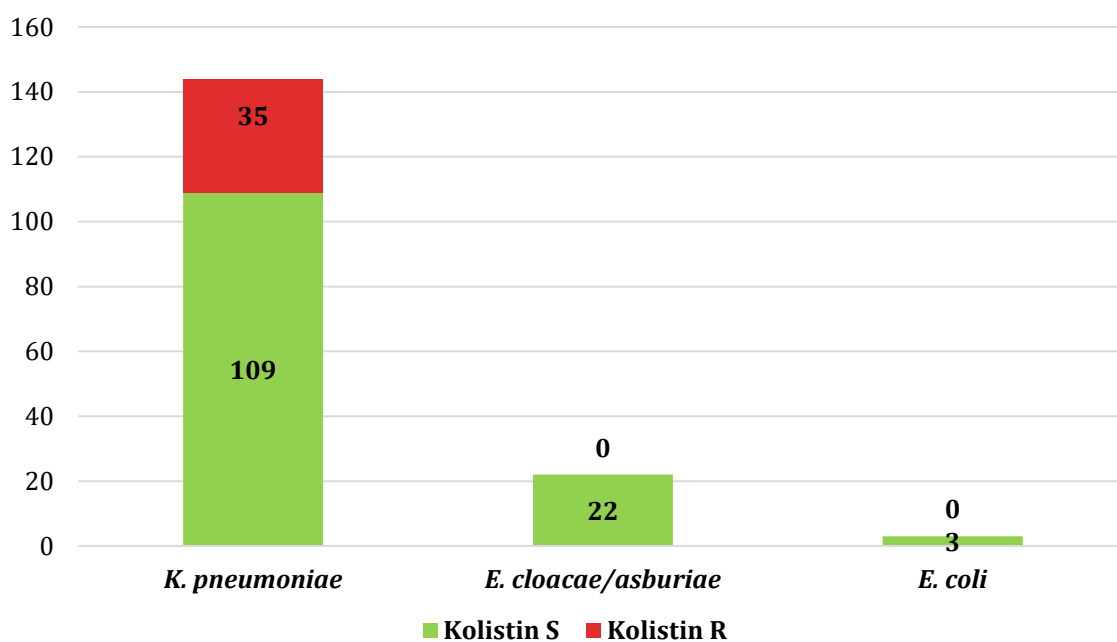
Antibiotik	S (%)	I (%)	R (%)
Piperacilin-tazobaktam	0	0	100
Ceftriakson	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Cefepim	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Imipenem	0	17,6	82,4
Ciprofloksacin	0	0	100
Levofloksacin	0	0	100
Gentamicin	0	NP	100
Amikacin	29,4	NP	70,6
Trimetoprim-sulfametoksazol	5,9	0	94,1
Tigeciklin <sup>a</sup>	94,1 „wild type”	5,9 „non wild type”	

S-osetljiv, standardni režim doziranja; I-osetljiv, povećana izloženost; R-rezistentan; NP-nije primenljivo; <sup>a</sup>-na osnovu ECOFF.

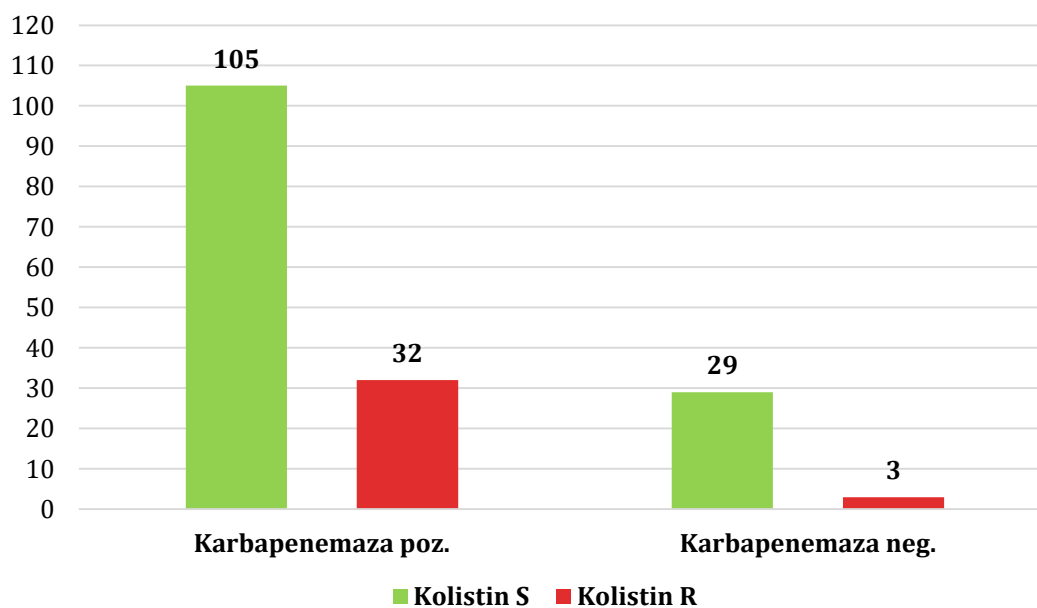
#### 4.3.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na kolistin bujon mikrodilucionom metodom

Osetljivost na kolistin određena je bujon mikrodilucijom za sve izolate enterobakterija uključene u studiju, osim za 10 izolata onih vrsta koje pokazuju urođenu rezistenciju na kolistin: *P. mirabilis*, *Providencia* spp. i *S. marcescens*.

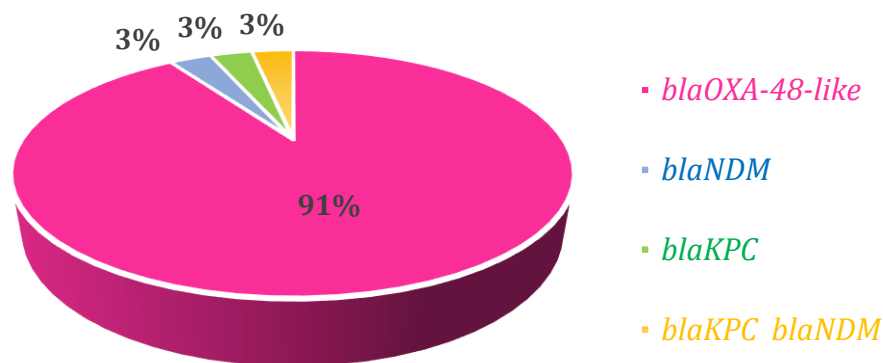
Od 169 testiranih izolata, rezistencija na kolistin je utvrđena kod 35 (20,7%, 95% CI 14,9-27,6%). Rezistencija na kolistin detektovana je kod 32/137 (23,4%, 95% CI 16,6-31,3%) karbapenemaza-produkujućih izolata, i to isključivo kod *K. pneumoniae*. Raspodela osetljivosti na kolistin prema vrstama enterobakterija prikazana je na Grafikonu 5. Raspodela osetljivosti na kolistin kod karbapenemaza-pozitivnih i karbapenemaza-negativnih vanbolničkih izolata enterobakterija prikazana je na Grafikonu 6. Raspodela gena za karbapenemaze kod karbapenemaza-produkujućih kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 5. Raspodela osetljivosti na kolistin prema vrstama enterobakterija.



Grafikon 6. Raspodela osetljivosti na kolistin kod karbapenemaza-pozitivnih i karbapenemaza-negativnih vanbolničkih izolata enterobakterija.



Grafikon 7. Raspodela gena za karbapenemaze kod karbapenamaza-produkujućih kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae*.

#### 4.4. Detekcija mehanizama rezistencije na kolistin

WGS za 17 reprezentativnih kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* nije dokazao *mcr* gene (*mcr* 1-5), karakteristične za rezistenciju na kolistin posredovanu plazmidom.

Kod svih ispitanih izolata nađene su mutacije u PhoP/PhoQ regulatornom sistemu hromozomskog *mgrB* gena. Mutacije su bile uglavnom po tipu SNPs, sa posledičnom supstitucijom aminokiselina u sastavu MgrB proteina.

Najčešće detektovana mutacija kod 16 (94,1%) izolata bila je supstitucija Cys→Ser na poziciji 28 (MgrB<sup>C28S</sup>), i prvi put je nađena kod izolata iz ove studije. Dovodi do hiperekspresije *pmrHFIJKLM* operona i do smanjene osetljivosti na kolistin.

Kod jednog (5,9%) izolata nađena je mutacija koja dovodi do prevremenog stop kodona, i to: MgrB<sup>K3\*</sup>.

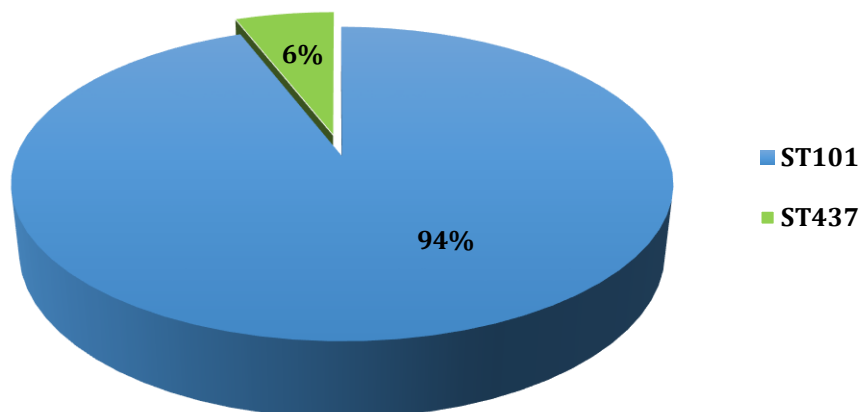
##### 4.4.1. MALDI-TOF MS analiza lipida A kolistin-rezistentnih izolata

Masena spektrometrija lipida A kolistin-rezistentnih izolata rađena je uporedo sa analizom kolistin-osetljivog referentnog soja *K. pneumoniae* ATCC®11296™. Kolistin-rezistentni izolati pokazali su dodatni pik na masenom spektru na 1971 m/z, koji potiče od dodavanja L-Ara-4N (131 m/z) lipidu A (1840 m/z). Ova modifikacija lipida A javlja se usled hiperekspresije *pmrHFIJKLM* operona, i dovodi do smanjene osetljivosti na kolistin. Nije uočena promena masenog spektra koja bi odgovarala dodavanju pEtN na lipid A, karakteristična za modifikaciju posredovanu *mcr* genima.

#### 4.4.2. Molekularna tipizacija kolistin-rezistentnih izolata

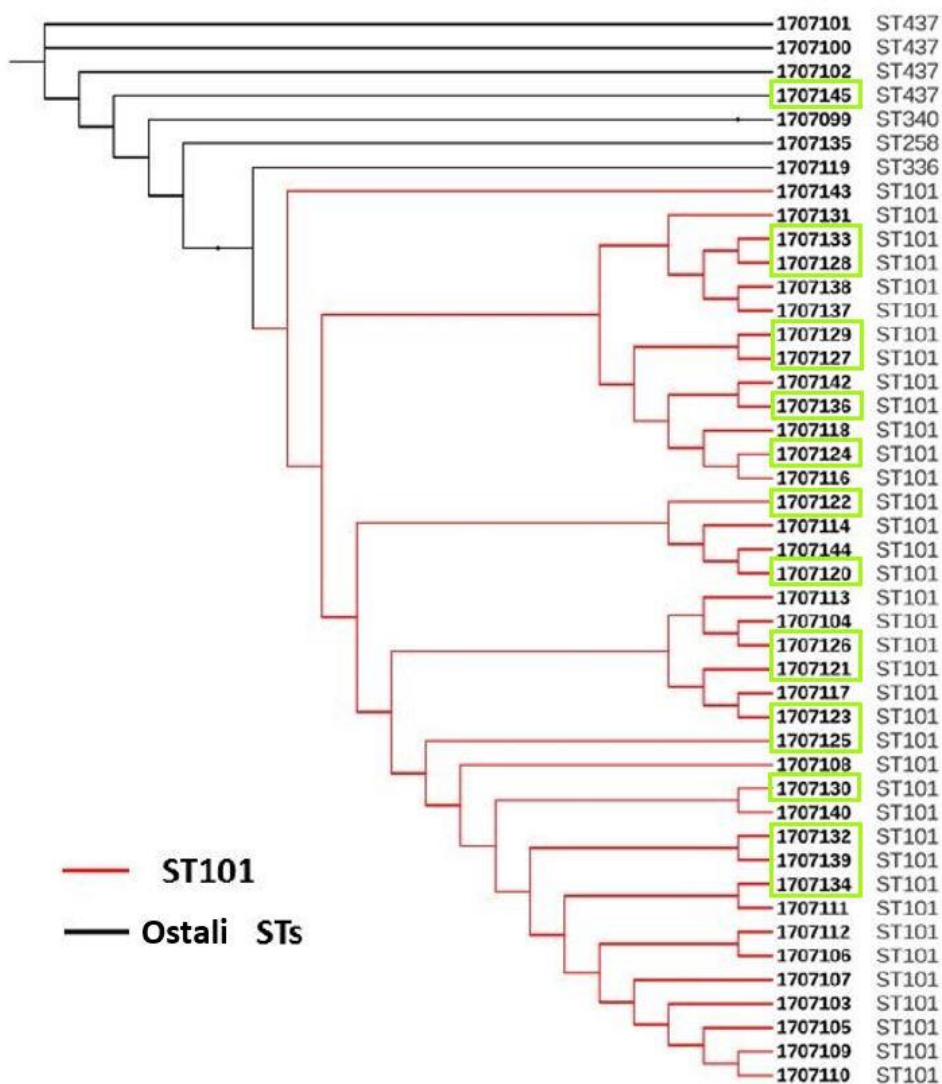
Molekularna tipizacija kolistin-rezistentnih karbapenamaza-produkujućih vanbolničkih izolata *K. pneumoniae* rađena je *in silico* MLST metodom, na osnovu podataka dobijenih WGS.

Dva različita tipa sekvenci identifikovana su kod ispitivanih izolata. Najčešći tip bio je ST101, u koji je svrstano 16 (94%) izolata, a koji su pripadali klonalnoj grupi CG101. Jedan (6%) izolat je pripadao ST437, i svrstan je u CG258 (Grafikon 8).



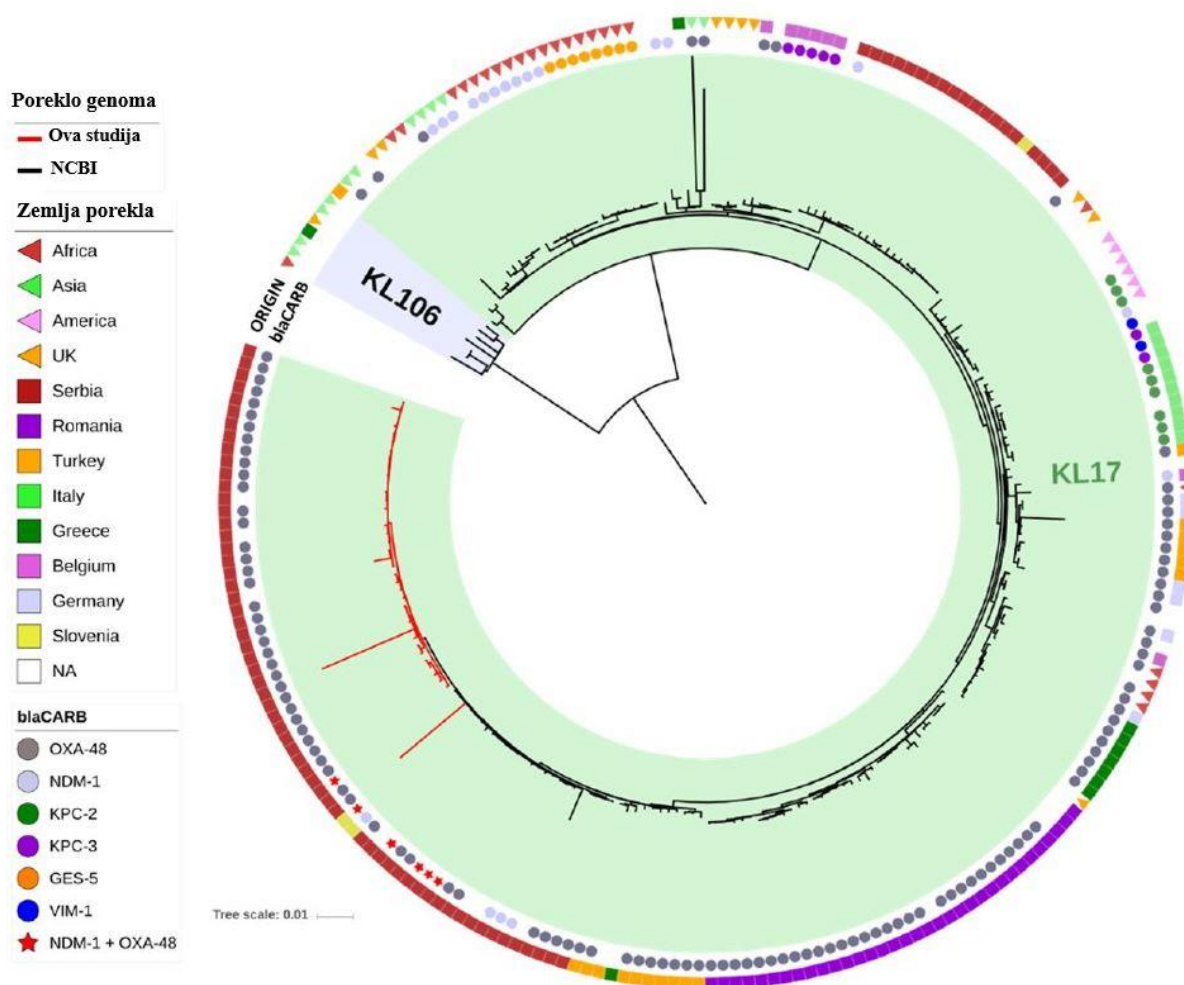
Grafikon 8. Tipovi sekvenci kolistin-rezistentnih karbapenamaza-produkujućih vanbolničkih izolata *K. pneumoniae*.

Izolati grupisani u ST101 pokazali su polimorfizam na nivou pojedinačnih nukleotida (SNPs) u rasponu od pet do 893 (srednja vrednost 107, medijana 61), i smatraju se blisko povezanim. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu SNPs za kolistin-rezistentne vanbolničke izolate *K. pneumoniae* prikazano je na Slici 24. U filogenetsku analizu uključena su i 28 kolistin-rezistentna bolnička izolata *K. pneumoniae* poreklom iz Srbije.



Slika 24. Konzensus stablo maksimalne parsimonije na osnovu SNPs za 45 kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* iz Srbije. Studijski izolati su označeni zelenom bojom.

Genomi izolata koji pripadaju ST101 su upoređivani sa genomima 195 izolata iz NCBI baze, za koje je *in silico* MLST analizom utvrđeno da pripadaju ST101. Ispitivani izolati pokazali su diverzitet na nivou SNPs u rasponu od jedan do 1547 (srednja vrednost 195, medijana 135). Filogenetska analiza pokazala je dve jasno odvojene linije, sa grupisanjem studijskih izolata u isti klaster sa izolatima iz Srbije, Slovenije, Grčke i Turske (Slika 25). Izolati koji su pripadali drugim tipovima sekvenci svrstani su u jedinstvenu monofiletsku podkladu u okviru CG258.



Slika 25. Filogenetsko stablo ST101 *K. pneumoniae* izolata iz ove studije (crvena linija) i izolata iz NCBI baze (crna linija). Prikazani su i tipovi karbapenemaza (unutrašnji krug) i zemlja porekla (spoljašnji krug).



#### 4.4.3. Detekcija i karakterizacija plazmida

Svi kolistin-rezistentni, karbapenemaza-produkujući vanbolnički izolati *K. pneumoniae* bili su *bla*<sub>OXA-48</sub> pozitivni. Širenje *bla*<sub>OXA-48</sub> gena među enterobakterijama povezano je sa IncL/M tipom konjugativnog plazmida. Utvrđivanje prisustva ovog plazmida rađeno je PlasmidFinder alatom, ali kod analiziranih izolata nije detektovan IncL/M replikon.

Radi detaljne karakterizacije genomske okruženja *bla*<sub>OXA-48</sub> gena, na reprezentativnom izolatu *K. pneumoniae* (No. 1707139) urađeno je sekvenciranje na MinION platformi.

Sekvenciranjem *bla*<sub>OXA-48</sub> gen je lociran na novom plazmidu od 83.654 bp, nazvanom pSRB\_OXA-48. Na njemu se, pored *bla*<sub>OXA-48</sub> gena, nalaze i drugi geni rezistencije: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *tet(D)*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *catB3-like*, *aac(3')-IIa* i *dfrA14* (Slika 26).

BLAST analiza je utvrdila da se radi o hibridnom plazmidu. Jedan fragment pokazuje 99,7% sličnosti sa IncFIA-IncR pKp\_Goe\_641-1 plazmidom (CP018737.1), koji je nosilac različitih gena rezistencije: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *aac(3)-IIa*, *catB3*, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(6')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1A</sub> i *dfrA14*. Drugi fragment je identičan IncL/M plazmidu pKp\_Goe\_641-2 (CP018736.1) i nosilac je *bla*<sub>OXA-48</sub> gena (Slika 26).

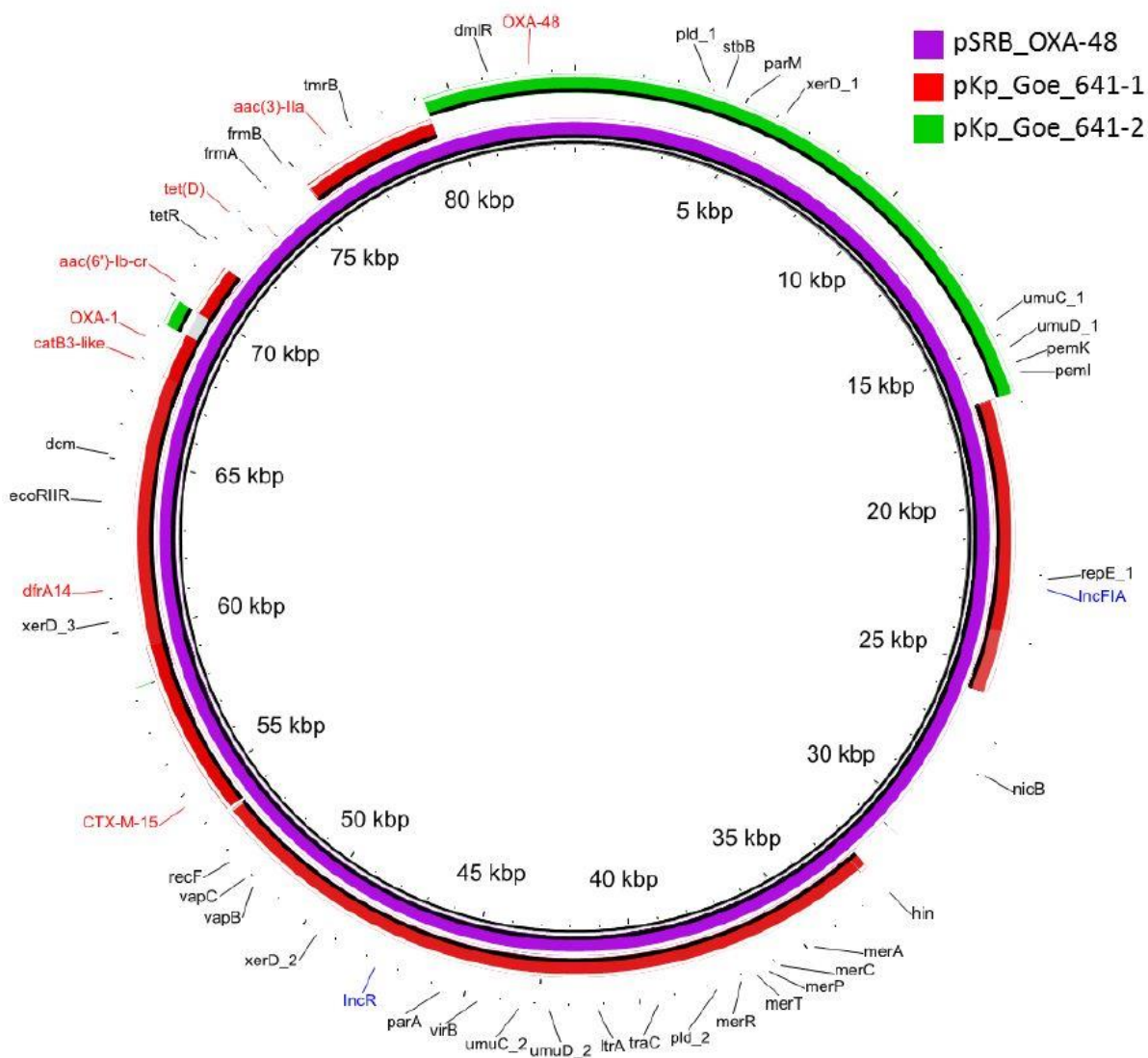
Oba plazmida su opisana kod izolata *K. pneumoniae* Kp\_Goe\_121641 (Accession no. NZ\_CP018735.1) pacijenta iz Severne Afrike hospitalizovanog u Nemačkoj 2013. godine. Ovaj izolat takođe pripada ST101, i pokazuje medijanu od 142 SNPs (od 134 do 601) u odnosu na ST101 studijske izolate.

Za utvrđivanje rekombinantnih mehanizama, odnosno porekla novog pSRB\_OXA-48 plazmida, urađena je komparativna analiza sa pKp\_Goe\_641-1, kao i sa pRA35 (LN864821.1) IncL/M plazmidom, koji je sličan pKp\_Goe\_641-2, ali ima intaktnu strukturu Tn6237 transpozona, nosioca *bla*<sub>OXA-48</sub> gena.

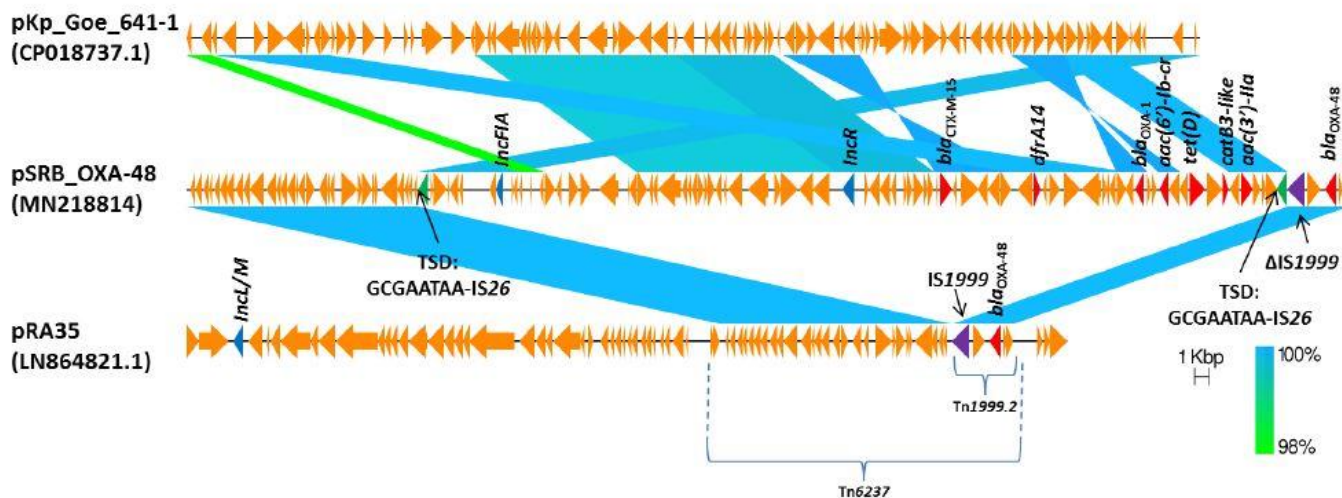
Detaljna analiza pokazala je da pSRB\_OXA-48 plazmid sadrži izmenjenu kopiju Tn6237, u koji je umetnut IS26 kompozitni transpozon od 73,7 Kbp, sličan sa pKp\_Goe\_641-1. Ovaj zaključak potkrepljuje prisustvo dupliranih sekvenci (engl. *Target Site Duplication*, TSD) od 8 bp (5'-GCGAATAA-3') na krajevima kompozitnog transpozona (Slika 27).

Rezultati mapiranja gena dobijenih sekvenciranjem na Illumina platformi pokazali su prisustvo pSRB\_OXA-48 plazmida kod svih ST101/*bla*<sub>OXA-48</sub> pozitivnih studijskih izolata.

Izolat koji je pripadao tipu sekvence ST437 (izolat 1707145), nije imao pSRB\_OXA-48 plazmid, kao ni IncFIA i IncR replikone. Kod njega je detektovan klasični IncL/M replikon sa *bla*<sub>OXA-48</sub> genom.



Slika 26. Slika generisana u BLAST: pSRB\_OXA-48 plazmid ST101 izolata *K. pneumoniae* No.1707139 (ljubičasti krug) u odnosu na dva glavna plazmida ST101 izolata Kp\_Goe\_1216141 (pKp\_Goe\_641-1, crveni krug i pKp\_Goe\_641-2, zeleni krug). Prikazani su delovi sa više od 95% sličnosti. Geni rezistencije su označeni crvenom bojom, replikoni plazmida plavom, ostali geni crnom bojom.



Slika 27. Poređenje pSRB\_OXA-48, pKpGoe\_641-1 i pRA35 plazmida. Prikazani su i geni rezistencije, replikoni plazmida i mobilni elementi. TSD, Target Site Duplication.

## ***5. DISKUSIJA***

---

Antimikrobna rezistencija predstavlja aktuelni, globalni javnozdravstveni problem. Bolnička sredina se smatra glavnim rezervoarom rezistentnih sojeva bakterija, i većina istraživanja je usmerena na uzročnike intrahospitalnih infekcija.

Od 2013. godine u Srbiji se sprovodi nadzor nad antimikrobnom rezistencijom, i od tada je naša zemlja deo centralnoazijske i evropske mreže za nadzor nad antimikrobnom rezistencijom (engl. *Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance*, CAESAR). U okviru CAESAR mreže prati se rezistencija na antibiotike invazivnih izolata, stoga je važno naglasiti da se podaci odnose uglavnom na bolničku populaciju, i da ne reprezentuju rezistenciju kod izolata uzročnika vanbolničkih infekcija (60). Prema CAESAR izveštajima (<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications>), u Srbiji postoji visoka stopa rezistencije na antibiotike kod *K. pneumoniae* i *E. coli*, koja je među najvišima u Evropi. Uočava se trend rasta stope rezistencije na karbapeneme, posebno kod *K. pneumoniae*, sa 36% 2013. na 42% 2018. godine. Zabrinjava činjenica da je od 2014. godine, od kada se prati rezistencija na kolistin, kao rezervnog antibiotika za lečenje MDR infekcija, takođe uočen porast stope rezistencije kod *K. pneumoniae* sa 13% 2014. na 26,3% 2018. godine. Kod *E. coli*, u navedenom periodu, rezistencija na karbapeneme se održavala na nivou od oko 1%, i bila je među najvišim u Evropi, dok rezistencija na kolistin kod *E. coli* nije potvrđena.

Visoka stopa antimikrobne rezistencije u Srbiji usko je povezana sa visokom potrošnjom antibiotika. Srbija je uključena u mrežu zemalja koje nisu članice Evropske unije (istočnoevropske i centralnoazijske zemlje) za praćenje potrošnje antimikrobnih lekova koju je osnovala SZO (81). Rezultati su pokazali da je ukupna potrošnja antibakterijskih lekova, izražena kao broj definisanih dnevnih doza (DDD) leka/1000 stanovnika na dan (DID) pokazala porast potrošnje u periodu od 2011-2015. godine sa 26,4 DID na 36,5 DID. Po potrošnji antibiotika za oralnu primenu, koji se najviše upotrebljavaju u vanbolničkoj populaciji, Srbija se nalazila na drugom mestu, iza Turske. U poređenju sa podacima ECDC (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data>) za 2017. godinu, Srbija se sa potrošnjom od 24,5 DID antibiotika za sistemsku primenu nalazi na sedmom mestu u Evropi. Dodatno zabrinjava visoka stopa potrošnje cefalosporina i karbapenema za sistemsku upotrebu, prema kojoj se naša zemlja nalazi na trećem mestu u Evropi, iza Kipra i Rumunije. U poređenju sa prosečnom potrošnjom antibiotika u vanbolničkoj populaciji u Evropi, koja je iznosila 18,5 DID za 2017. godinu, uočava se da je potrošnja antibiotika u Srbiji značajno veća od evropskog proseka, ali je potrebno imati u vidu da podaci o potrošnji antibiotika za našu zemlju obuhvataju objedinjene podatke iz vanbolničkih i bolničkih ustanova.

Ako se u obzir uzme prethodno navedeno, kao i činjenica da se najveća potrošnja antibiotika registruje u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (90%) (82), može se očekivati visoka stopa antimikrobne rezistencije u vanbolničkoj populaciji u Srbiji. Međutim, ovakva istraživanja u našoj zemlji nisu rađena, i podaci o stečenoj rezistenciji kod vanbolničkih bakterijskih izolata uglavnom su nepoznati.

Istraživanja o antimikrobnoj rezistenciji u vanbolničkoj populaciji nisu brojna ni u svetu, i pojavila su se u poslednjih desetak godina. Kelly i sar. su u sistematskom pregledu studija o CRE u vanbolničkoj sredini pokazali da je njihova učestalost u širokom rasponu od 0-29,5% (0,04% u Australiji, od 5,6-10,8% u SAD, 18,2% u Španiji, 29,5% u Tajvanu), i istakli da je neophodan pojačan nadzor nad ovim bakterijama zbog njihove diseminacije u vanbolničku populaciju (57). Udeo CPE u rezistenciji na karbapeneme kod enterobakterija nije određivan u studijama uključenim u ovaj sistematski pregled. U Belgiji je 2015. godine sprovedena studija u kojoj su učestvovala bolničke i privatne mikrobiološke laboratorije koje

obrađuju uzorke iz primarne zdravstvene zaštite (58). Iznenađujuće, rezultati su pokazali da se učestalost CPE kod bolničkih pacijenata (0,55%) gotovo ne razlikuje od učestalosti CPE kod ambulantnih pacijenata, koja je iznosila 0,6%. U četvorogodišnjem istraživanju u Madridu, koje je obuhvatilo 17.031 izolat enterobakterija pacijenata iz primarne zdravstvene zaštite, zastupljenost CPE bila je 0,36% (83). Nadzor nad antimikrobnom rezistencijom kod Gram-negativnih vanbolničkih izolata enterobakterija iz uzoraka urina, sproveden 2012. godine u Australiji, pokazao je da su karbapenemaze u ovoj zemlji izuzetno retke, odnosno dokazane su kod dva (0,07%) od 2802 testirana izolata enterobakterija (84). Istraživanja bazirana na skriningu uzoraka fecesa na prisustvo karbapenemaza u vanbolničkoj populaciji u Holandiji, Švajcarskoj i u Londonu, Velika Britanija nisu potvrdila prisustvo CPE (85-87).

Naše istraživanje rađeno je na teritoriji Beograda, grada sa najvećim brojem stanovnika u Republici Srbiji (oko 25% ukupnog broja). U njemu su učestvovala mikrobiološke laboratorije koje obrađuju uzorke iz primarne zdravstvene zaštite, i to GZJZ Beograd, koji analizira uzorke iz svih domova zdravlja na teritoriji grada, kao i Zavod za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum“, Beograd, koji obrađuje uzorke vanbolničkih pacijenata iz privatne prakse. Od 179 vanbolničkih izolata enterobakterija, koji su uključeni u studiju jer su imali pozitivan skrining na produkciju karbapenemaza, geni za ove enzime su dokazani kod 80,4% izolata. Produkcija karbapenemaza je dominantan mehanizam rezistencije na karbapeneme kod ispitivanih izolata. Određivanje drugih mehanizama rezistencije nije bilo predmet ovog istraživanja.

Utvrđena učestalost CPE u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda je 0,34%. Jedina studija rađena u Srbiji, koja je određivala učestalost produkcije karbapenemaza kod multirezistentnih bolničkih izolata *K. pneumoniae* i *E. coli*, pokazala je prisustvo gena za karbapenemaze kod 45% (58/129) izolata (61). Ukoliko uporedimo učestalost CPE dobijenu u našem istraživanju i rezultat iz navedene studije Trudić i sar., uočava se statistički značajno manja učestalost CPE u vanbolničkoj nego u bolničkoj populaciji ( $p < 0,001$ ). Glavni faktori rizika za infekcije izazvane CPE, kao što su hospitalizacija, antibiotska terapija, mehanička ventilacija i primena urinarnih katetera (88), usko su vezani za bolničku sredinu i najviše doprinose razlici u učestalosti CPE u bolničkoj i vanbolničkoj populaciji. Iako je prema incidenciji CPE na 100.000 pacijenata/dana Srbija na petom mestu u Evropi (53), može se očekivati i da je učestalost CPE u vanbolničkoj populaciji viša u odnosu na druge zemlje. Međutim, dobijena učestalost u našem istraživanju ne odstupa značajno od rezultata u sličnim, prethodno navedenim istraživanjima u Belgiji ( $p = 0,055$ ) i Španiji ( $p = 0,707$ ) (58,83).

Najčešći uzorak iz kojeg su izolovane CPE bio je urin (88,8%). Ovakav rezultat dobijen je i u belgijskoj studiji Huang i sar. (100% uzoraka), kao i kod Paño-Pardo i sar. (73,9%) za uzorke vanbolničkih pacijenata u Madridu (58,83). Prva karbapenemaza kod enterobakterija u Srbiji detektovana je 2011. godine upravo kod izolata iz urina. Izolovana je *K. pneumoniae* sa *bla<sub>NDM</sub>* genom, kod pacijenta koji nije imao znake urinarne infekcije, već se radilo o kolonizaciji CPE sojem (89). Kolonizacija gastrointestinalnog trakta MDR bakterijama, uključujući i CPE, jedan je od glavnih razloga za visoku učestalost CPE izolata iz uzoraka urina, pored fecesa i rektalnog brisa, koji su sa druge strane skrining uzorci. Faktori rizika za CPE kolonizaciju vezani su za boravak u bolnici (primena katetera, antibiotska terapija, boravak u jedinicama intenzivnog lečenja i drugo), i izloženost ovim faktorima dovodi uglavnom do dugotrajne kolonizacije CPE sojevima, sa posledičnim širenjem iz bolničke u vanbolničku sredinu (7,83).

U ovom radu geni za karbapenemaze dokazani su kod pet različitih vrsta enterobakterija. Statistički značajno veća učestalost produkcije karbapenemaza utvrđena je

kod *K. pneumoniae*, što je očekivano, uzimajući u obzir epidemiološke podatke na globalnom nivou (52). Na drugom mestu po učestalosti je *E. cloacae/asburiae*, i podaci iz ove studije su prvi podaci o ovoj vrsti u našoj zemlji. *E. cloacae* je danas, posle *K. pneumoniae*, najčešće izolovana CPE u mnogim delovima sveta (90). Istraživanja o antimikrobnoj rezistenciji kod *E. coli* su među najbrojnijima, a rezultati pokazuju nisku učestalost CPE izolata (53,60,91). Zastupljenost *E. coli* među vanbolničkim CPE izolatima na teritoriji Beograda je takođe niska (2%). CPE *Providencia* spp. i *P. mirabilis* nisu detektovani u istraživanjima koja su obuhvatila vanbolničku populaciju (58,83-87), i javljaju se sporadično kao izazivači intrahospitalnih infekcija (55,92-94). Podaci dobijeni u ovoj studiji su među prvima o učestalosti u vanbolničkoj populaciji, prema kojima je CPE *Providencia* spp. češće izolovana od *E. coli* (4% svih CPE izolata), dok *P. mirabilis* čini 1% CPE izolata.

Od pet gena za karbapenemaze koji su testirani, kod studijskih izolata dokazana su četiri tipa: *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>VIM</sub>. Nije nađen *bla*<sub>IMP</sub> gen, koji se inače retko detektuje kod enterobakterija, kako u vanbolničkoj (58,83-87) tako i u bolničkoj sredini (95-97), ali ima i drugačijih podataka, prema kojima je ovo lokalno dominantan tip u Australiji (98). U Srbiji, IMP tip karbapenemaza dokazan je kod *P. mirabilis* izolata, uzročnika bolničke epidemije na odeljenju intenzivnog lečenja (99).

OXA-48-like karbapenemaze danas su globalno najrasprostranjenije zahvaljujući osobinama IncL/M plazmida, glavnog nosioca *bla*<sub>OXA-48</sub> gena. Ovaj plazmid poseduje izuzetan potencijal horizontalnog transfera, čak 40 puta veći nego plazmid sa *bla*<sub>NDM</sub> genom (100). Kao primer dramatičnog širenja OXA-48-like produkujućih sojeva enterobakterija Girmenia i sar. su naveli Maltu, gde je od sporadičnog javljanja infekcija izazvanih ovim bakterijama do 2010. godine, ova zemlja 2013. godine postala endemsko područje (26). Najčešći izazivači bolničkih epidemija su *K. pneumoniae* i *Enterobacter* spp., dok su OXA-48-like pozitivni sojevi *E. coli* važni izazivači vanbolničkih infekcija (27). OXA-48-like produkujući izolati enterobakterija su se iz Turske, gde su prvi put potvrđeni 2003. godine, širili dominantno na Bliskom Istoku (Jordan, Liban, Iran) i u Severnoj Africi (Alžir, Maroko, Tunis, Egipat). Ovo su i danas endemska područja, ali su dokazane na svim kontinentima, osim Antarktiku (26,27). Uočena je klonalna distribucija OXA-48-like produkujućih enterobakterija. Kod *K. pneumoniae* dominantni klonovi pripadaju ST101, ST395, ST15 i ST147, kod *E. coli* tipovima ST38, ST131, ST410, a kod *Enterobacter* spp. globalno najrasprostranjeniji su ST114, ST93 i ST78 (26,27).

Velika evropska studija (EuSCAPE) koja je ispitivala bolničke izolate *K. pneumoniae* i *E. coli* nije utvrdila OXA-48-like karbapenemaze kod izolata iz Srbije (bio je prisutan samo *bla*<sub>NDM</sub> gen) (53). Međutim, u prethodno navedenom istraživanju Trudić i sar., *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gen bio je drugi po učestalosti (iza *bla*<sub>NDM</sub> gena) kod bolničkih multirezistentnih izolata *K. pneumoniae* i *E. coli* (61). Novović i sar. su kod kolistin-rezistentnih, karbapenemaza-produkujućih izolata *K. pneumoniae* iz Srbije detektovali *bla*<sub>OXA-48</sub> gen kod 85% ispitivanih izolata (63). Među njima su utvrđeni ST101, kao najčešći (koji je dominantan i u Evropi i Severnoj Africi), zatim ST888, ST437, ST336 i ST307 (63).

Gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub> utvrđen je sa statistički značajno većom učestalošću u odnosu na sve ostale gene ( $p < 0,001$ ), kod 64,6% CPE u ovom istraživanju. Podaci u drugim istraživanjima vanbolničkih karbapenemaza govore u prilog tome da je *bla*<sub>OXA-48-like</sub> takođe najčešća u vanbolničkoj populaciji (58,83,101). Ovaj gen je najzastupljeniji kod *K. pneumoniae*, kako u navedenim evropskim studijama vanbolničkih izolata, tako i u ovoj studiji, kod izolata vanbolničkih pacijenata na teritoriji Beograda. Poređenjem zastupljenosti *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena kod vanbolničkih izolata iz ove studije i kod bolničkih izolata *K. pneumoniae* Trudić i sar., pokazano je da se statistički značajno češće javlja kod vanbolničkih izolata ( $p < 0,001$ ). Prema

epidemiološkim studijama sprovedenim na globalnom nivou, endemska područja, odnosno glavni rezervoari OXA-48 enzima, su Bliski Istok, Severna Afrika i Mediteranske zemlje (26,27). Imajući u vidu da su brojna istraživanja dokazala izuzetno visok potencijal širenja *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena (26,27,100,103), da se Srbija nalazi na migrantskoj ruti iz endemskih područja u Evropu, kao i da se putovanja smatraju jednim od glavnih faktora rizika za transmisiju karbapenemaza-produkujućih bakterija, posebno OXA-48 (26,27,88), može se zaključiti da je visoka učestalost ovog tipa karbapenemaza u vanbolničkoj populaciji očekivan rezultat.

Od svih tipova karbapenemaza, NDM se najbrže raširila u celom svetu. Prvi put je otkrivena 2008. godine, i do 2013. godine detektovana je u više od 40 zemalja (54). Potiče sa Indijskog subkontinenta, iako je prvi put detektovana kod *K. pneumoniae* izolovane iz urina pacijenta u Švedskoj, koji je bio hospitalizovan u Nju Delhiju, Indija. Nakon ovog otkrića, NDM je potvrđena u više regija u Indiji, Pakistanu i Bangladešu, kako kod bakterijskih izolata humanog porekla, tako i u uzorcima iz životne sredine, pre svega vode (55). Internacionalno širenje *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnih klonova enterobakterija dovodi se u vezu sa medicinskim turizmom, što se smatra glavnim razlogom širenja na Balkansko poluostrvo, koje je pored Indijskog subkontinenta, drugo endemsko područje (54,55). Važan rezervoar *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnih izolata su i Bliski Istok, Severna i Centralna Afrika.

Nekoliko studija potvrdilo je prisustvo *bla*<sub>NDM</sub> gena u Srbiji, prvo kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* (104), ali je prisutan i kod enterobakterija (*K. pneumoniae* i *E. coli*) (53,61,63,89,105). Trudić i sar. su na teritoriji Srbije u periodu od 2013-2014. godine, kod bolničkih multirezistentnih izolata *K. pneumoniae* i *E. coli*, *bla*<sub>NDM</sub> gen potvrdili kod 38% izolata (61). Istraživanja sprovedena u Švajcarskoj, Nemačkoj, Francuskoj i Holandiji utvrdila su širenje *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnih klonova iz Srbije širom Evrope (106-110).

*bla*<sub>NDM</sub> gen je bio drugi po učestalosti u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda (20,8%). Detektovan je kod svih vrsta CPE u ovoj studiji. Najzastupljeniji je kod *E. cloacae/asburiae* (75% izolata ove vrste), kod koga se statistički značajno češće javlja u odnosu na sve vrste, osim *K. pneumoniae*. *bla*<sub>NDM</sub> je dominantni gen za karbapenemaze među bolničkim izolatima u Srbiji (61), i statistički se značajno češće javlja u bolničkoj u odnosu na vanbolničku populaciju ( $p < 0,001$ ). U malom broju dostupnih istraživanja u svetu, koja su obuhvatila izolate iz uzoraka vanbolničke populacije, ovaj gen je potvrđen u endemskim područjima za NDM karbapenemaze u Aziji (111,112), a u Evropi sporadično (113). Uzimajući u obzir da Srbija spada u endemska područja (24,54,58), visoka učestalost ovog tipa enzima i u vanbolničkoj populaciji ne iznenađuje. Putevi transmisije nisu dovoljno jasni, uglavnom su opisane intrahospitalne epidemije *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnim sojevima enterobakterija, ali se zna da CPE kolonizacija digestivnog trakta značajno doprinosi širenju rezistentnih klonova (86,87).

Otkriće prve KPC karbapenemaze 1996. godine u Severnoj Karolini, SAD ubrzo je bilo praćeno identifikacijom ovih enzima i u drugim delovima SAD. Prvi slučaj detektovan u Evropi 2005. godine povezuje se sa prelaskom pacijenta iz SAD u Francusku. Od tada se beleži stalni porast incidencije KPC-produkujućih enterobakterija, pre svega *K. pneumoniae*, u Mediteranskim zemljama, na Bliskom Istoku (Izrael), Centralnoj i Južnoj Americi i Aziji. Najuspešniji klonovi spadaju u klonalni kompleks CC258 i to tip sekvence ST258. Uočena je dominacija dve filogenetske grupe (klade): klade I, udružene sa diseminacijom KPC-2, i klade II udružene sa KPC-3 tipom enzima (12,14,24). U Evropi, najveći broj epidemija prijavljen je u Grčkoj, koja se od 2008. godine smatra endemskim područjem (52). Visoka incidencija KPC-produkujućih izolata *K. pneumoniae*, osim u Grčkoj, javlja se i u drugim Mediteranskim zemljama – Italiji, Španiji, Portugaliji i na Kipru (53). Isključivo u navedenim zemljama, koje su



rezervoar KPC-produkujućih izolata *K. pneumoniae*, utvrđeno je prisustvo ovih enzima i kod *E. coli*, najverovatnije usled horizontalnog prenosa gena rezistencije. Ova činjenica je zabrinjavajuća zbog velike verovatnoće širenja *E. coli* u vanbolničku sredinu, za razliku od *K. pneumoniae*, koja je dominantna u bolničkoj sredini (53). U Srbiji KPC je potvrđena kod 5% karbapenemaza-produkujućih bolničkih izolata *K. pneumoniae* (61).

Gen *bla*<sub>KPC</sub> se nalazi na trećem mestu po učestalosti (6,9%) prema rezultatima našeg istraživanja, i javlja se statistički značajno češće ( $p < 0,05$ ) nego kod bolničkih izolata u Srbiji (61). Iako se Srbija nalazi u blizini endemskih područja (Mediteran i Bliski Istok), ne može se reći da je došlo do značajne transmisije ovog gena. Putovanja se ne smatraju faktorom rizika za širenje *bla*<sub>KPC</sub>, iako je opisano par importovanih slučajeva. Kao rezervoar su u nekim studijama označeni domovi za stara lica, dok se u vanbolničkoj sredini detektuje sporadično (114,115).

VIM karbapenemaze su, nakon što su prvi put detektovane u Evropi 1996. i 1997. godine, dugo bile najzastupljenije metalo-beta-laktamaze, sve do otkrića NDM. Kod enterobakterija su potvrđene početkom XXI veka, endemski u Grčkoj i to VIM-2 tip enzima (52). Najčešće se javljaju kod izolata *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* i *Citrobacter* spp., u okviru bolničkih epidemija u Grčkoj i Italiji, dok se u ostalim delovima sveta javljaju sporadično (116). Broj molekularno-epidemioloških studija VIM karbapenemaza je ograničen. Postojeći podaci ukazuju na širenje *bla*<sub>VIM</sub> gena u okviru integrona klase I, pri čemu određeni tip integrona može cirkulisati lokalno između različitih vrsta bakterija (npr. In87 sa *bla*<sub>VIM-1</sub> genom u Grčkoj), ili se određeni tipovi integrona mogu javljati globalno, takođe kod različitih vrsta (npr. In110 sa *bla*<sub>VIM-1</sub> genom) (116).

Gen *bla*<sub>VIM</sub> je nađen kod 2,1% vanbolničkih izolata na teritoriji Beograda. U studiji sprovedenoj u Madridu, kod vanbolničkih izolata se nalazi na drugom mestu po učestalosti (16,2%) (83). Sporadično javljanje *bla*<sub>VIM</sub> produkujućih vanbolničkih sojeva enterobakterija utvrđeno je i u Grčkoj, koja se smatra endemskim područjem za VIM tip karbapenemaza (116,117). U Srbiji, *bla*<sub>VIM</sub> gen je prvi put detektovan 2011. godine kod izolata *P. mirabilis*, uzročnika bolničke epidemije (99). *P. mirabilis* je, uz *Providencia* spp., glavni nosilac ovog gena u našem istraživanju, stoga se može pretpostaviti da je došlo do transmisije ovog gena iz bolničke u vanbolničku populaciju.

Detekcija više gena za različite beta-laktamaze kod istog izolata se često opisuje u literaturi, i rezultat je intenzivne razmene genetskog materijala, pre svega plazmida, između bakterija. Koprodukcija karbapenemaza je karakteristična za područja koja su endemska za ove enzime (Mediteran, Bliski Istok, Indija), u kombinacijama koje zavise od zastupljenosti određenog tipa karbapenemaza (118-121). Imajući u vidu da se Srbija smatra endemskom regijom za *bla*<sub>NDM</sub>, može se očekivati pojava više različitih gena kod istog izolata. Među vanbolničkim izolatima enterobakterija na teritoriji Beograda 5,6% izolata je imalo dva različita gena za karbapenemaze. Šest izolata je imalo kombinaciju *bla*<sub>OXA-48-like</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> gena. Ova dva enzima nađena su kod *K. pneumoniae*, što je potvrđeno i kod bolničkih izolata ove vrste u Srbiji (61), ali su prvi put u ovom istraživanju detektovani kod *E. coli*, kao i kod *E. cloacae/asburiae* izolata, kod kojih se javlja statistički značajno češće u odnosu na ostale vrste CPE iz ove studije ( $p < 0,001$ ). Takođe, prvi put u ovoj studiji, potvrđeni su izolati *K. pneumoniae* sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> i *bla*<sub>KPC</sub>, odnosno *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> kombinacijom gena. U sistematskom pregledu Bush i sar., *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gen se najčešće javljao u kombinaciji sa drugim karbapenemazama, pre svega sa *bla*<sub>NDM</sub> (81% izolata), retko sa *bla*<sub>KPC</sub>. Gen *bla*<sub>KPC</sub> je obično detektovan kod izolata koji su imali MBL, posebno *bla*<sub>VIM</sub>, ređe *bla*<sub>NDM</sub> (122). Krajem 2018. godine uočava se još jedan, vrlo zabrinjavajući trend, kada je u SAD, iz urina vanbolničkog

pacijenta, izolovana *K. pneumoniae* sa tri gena za karbapenemaze: *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> (123).

Ako se uzmu u obzir rezultati dobijeni u ovoj studiji, kao i rezultati istraživanja Novović i sar. (63), u kojima se *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gen pokazao kao najčešći, moguće je pretpostaviti da je Srbija potencijalno endemsko područje, osim za NDM, i za OXA-48 karbapenemaze, i da je vanbolnička populacija potencijalni rezervoar *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena. Slična promena u zastupljenosti tipova karbapenemaza dogodila se u Hrvatskoj, gde je nakon perioda dominacije metalo-beta-laktamaza (*bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>VIM</sub> od 2012-2014. godine), u periodu 2013-2015. godine utvrđena najveća učestalost *bla*<sub>OXA-48</sub> gena (124). I druge studije su pokazale da se molekularna epidemiologija može dramatično promeniti u jednom regionu u kratkom vremenskom periodu, za samo nekoliko godina, što se dogodilo na Malti (101). Istraživanje Ćirković i sar., koje je obuhvatilo uzorke površinskih i otpadnih voda na teritoriji Beograda 2017. godine, utvrdilo je prisustvo *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena kod enterobakterija (125). U istoj studiji potvrđeni su i izolati sa *bla*<sub>NDM</sub> genom, šest godina nakon detekcije prvog kliničkog *bla*<sub>NDM</sub> izolata u Srbiji kao endemskom području (59). Poznato je da površinske i otpadne vode predstavljaju značajan rezervoar karbapenemaza u endemskim područjima (52,126), stoga rezultati Ćirković i sar. govore u prilog pretpostavke da je Srbija potencijalno endemsko područje za OXA-48 i NDM karbapenemaze.

Poseban segment ovog istraživanja predstavljala je genotipizacija izolata *K. pneumoniae* i *E. cloacae/asburiae*. ERIC-PCR metodom 88 izolata *K. pneumoniae* svrstano je u 26 klastera. Ova analiza je pokazala da je u vanbolničkoj populaciji karbapenemaza-produkujućih izolata *K. pneumoniae* 79 (89,8%) izolata bilo genski srodno, i raspoređeno u 17 klastera. Preostalih devet izolata pokazali su gensku raznolikost, i predstavljaju sporadične izolate. Najzastupljeniji klasteri, sa po 11 (po 12,5%) klonalno povezanih izolata, bili su klaster 7 i klaster 11. U klasteru 7 grupisani su svi izolati sa *bla*<sub>KPC</sub> genom. Ovako izražena klonalna povezanost karakteristična je za *bla*<sub>KPC</sub> pozitivne izolate. Prema rezultatima brojnih istraživanja, *bla*<sub>KPC</sub> se širi u vidu manjih ili većih epidemija, uglavnom među bolničkom populacijom (52,114,124-126). Kineska studija, koja je obuhvatila vanbolničke izolate *K. pneumoniae*, pokazala je klonalnu povezanost vanbolničkih izolata sa *bla*<sub>KPC</sub> genom, kao i njihovu povezanost sa bolničkim izolatima (127). Može se pretpostaviti da su izolati iz naše studije porekla od vanbolničkih pacijenata koji su prethodno bili hospitalizovani. U prilog tome govori i činjenica da je naše istraživanje rađeno na teritoriji Beograda, koji predstavlja najveći medicinski centar u Srbiji. Međutim, zbog nedostatka epidemioloških podataka, nije moguće utvrditi ovu povezanost.

Za razliku od *bla*<sub>KPC</sub> pozitivnih izolata, izolati *K. pneumoniae* sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom svrstani su u 20 različitih klastera. Imajući u vidu izuzetan potencijal širenja *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (26,27,100,103), heterogenost populacije sa ovim genom je očekivana. Međutim, klonalna povezanost i klonalna distribucija jasno se uočavaju među izolatima sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom. U ovoj studiji, drugi po zastupljenosti bio je klaster 11, sa 11/67 (16,4%) klonalno povezanih *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivnih izolata, dok je još 10 klastera imalo tri ili više klonalno povezanih izolata. Za osam klastera (2, 6, 11, 13, 14, 17, 18, 22) pokazana je statistički značajna povezanost sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom ( $p < 0,05$ ). Klonalna povezanost OXA-48 pozitivnih izolata potvrđena je u različitim istraživanjima, uglavnom bolničkih epidemija. Branias i sar. su u univerzitetnoj bolnici u Madridu, Španija sprovedli studiju tri godine nakon prve detekcije *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena u ovoj bolnici, i utvrdili klonalnu povezanost *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivnih izolata *K. pneumoniae* (131). Rezultati su potvrdili diseminaciju i perzistenciju OXA-48 karbapenemaza, uprkos primenjenim merama za kontrolu infekcija. Slični rezultati dobijeni su ispitivanjem 106 karbapenemaza-produkujućih, bolničkih izolata *K. pneumoniae* u

Portugaliji, gde se među četiri klona sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom, izdvajao klon C sa šest od 10 izolata (132). U prethodno pomenutoj belgijskoj studiji, jednoj od retkih koja je pored bolničkih obuhvatila i ambulantne pacijente iz privatnih laboratorija, molekularnom tipizacijom *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivnih izolata *K. pneumoniae* pokazana je poliklonalna distribucija (58). Međutim, postojanje klastera sa klonalno povezanim sojevima ukazivalo je na epidemijsko širenje. Dokazana je intrahospitalna klonalna diseminacija, ali i prisutvo istih klonova u bolničkoj i vanbolničkoj populaciji. Na osnovu ovih rezultata, kao i male geografske udaljenosti (manje od 30 km) laboratorija uključenih u istraživanje, autori su pretpostavili da je moguća epidemiološka povezanost između dva različita zdravstvena sektora. U drugoj belgijskoj studiji, Heinrichs i sar. su ispitujući bolničku epidemiju *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnim sojevima, pokazali povezanost sa sojevima iz druge bolnice, gde je nulti slučaj bio vanbolničkog porekla (133). U našem istraživanju utvrđena je klonalna povezanost *bla*<sub>NDM</sub> pozitivnih izolata, među kojima su se izdvojila dva klona, sa sedam od 10 izolata. Iz svega prethodno navedenog jasno je da postoji klonalna povezanost i distribucija među vanbolničkim izolatima *K. pneumoniae* u Beogradu. Radi utvrđivanja puteva širenja, odnosno porekla epidemijskih klonova, potrebne su detaljnije populacione analize, bazirane na savremenim metodama tipizacije, kao što je WGS.

ERIC-PCR tipizacija rađena je i za 17 izolata *E. cloacae/asburiae*. Broj molekularno-epidemioloških studija o *Enterobacter* spp. je ograničen. Značajan broj istraživanja govori u prilog izražene genske raznolikosti karbapenem-rezistentnih *E. cloacae/asburiae* izolata na globalnom nivou (134,135). U ovim studijama nisu definisani specifični, visoko rizični klonovi sa velikim potencijalom širenja. Na primer, u prethodno pomenutom istraživanju Branas i sar. u Madridu, izolati *E. cloacae* pokazali su izražen diverzitet (35 izolata svrstano je u 16 klonova) (131). Mogući razlog za ovako heterogene rezultate je potcenjena zastupljenost karbapenem-rezistentnih *E. cloacae/asburiae*, usled malog broja istraživanja ove bakterije (136). U jednom od najobimnijih istraživanja, Peirano i sar., dokazano je lokalno širenje klonova, sa specifičnim genetskim elementima, uključujući i gene za karbapenemaze (134). U ovom istraživanju izolati iz Srbije sa *bla*<sub>NDM</sub> genom su svrstani u isti klon. Dodatno, pokazano je da pripadaju istoj kladi, ST114A, kao i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivni izolati sa Bliskog Istoka (iz Tunisa, Maroka, Kuvajta).

U našem istraživanju od 6 klastera *E. cloacae/asburiae*, tri klastera su imala po jedan izolat, odnosno radilo se o sporadičnim sojevima. Većina izolata (82,3%) svrstana je u tri klona. Utvrđena je statistički značajna udruženost *bla*<sub>NDM</sub> sa klasterima 5 i 6 ( $p < 0,05$ ), kao i statistički značajna udruženost klastera 6 sa dva gena za karbapenemaze, *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> ( $p < 0,05$ ). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno navedenim rezultatima Peirano i sar. o lokalnoj diseminaciji klonova sa specifičnim genetskim karakteristikama. Rezultati naše studije, prve u Srbiji koja je obuhvatila karbapenem-rezistentne izolate *E. cloacae/asburiae*, pokazali su klonalnu povezanost i distribuciju među vanbolničkim izolatima ove bakterije (137). Kao što je istaknuto za *K. pneumoniae*, za bolje razumevanje molekularne epidemiologije *E. cloacae/asburiae* bilo bi potrebno primeniti savremene metode tipizacije.

Osetljivost na antibiotike karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija, testirana disk difuzionom metodom, pokazala je MDR fenotip kod svih izolata. Rezistencija na peniciline, peniciline sa inhibitorima beta-laktamaza, cefalosporine, fluorohinolone i ertapenem bila je izuzetno visoka, veća od 99%. Više od 95% izolata pokazalo je rezistenciju na trimetoprim-sulfametoksazol i aztreonam. Zabrinjavajuća činjenica je da je pet (2,8%) izolata bilo rezistentno na sve ispitivane agense. Pošto u ovoj studiji nije testiran fosfomicin, kao ni tigecklin (osim za *E. cloacae/asburiae*), ovi izolati se ipak ne mogu okarakterisati kao panrezistentni, odnosno rezistentni na sve postojeće antimikrobne agense

(engl. *Pandrug-resistant*, PDR) (5). Iz prethodno navedenog jasno je da je odabir terapije za MDR CPE veoma složen, i zahteva individualni pristup na osnovu profila osetljivosti uzročnika infekcije, tipa i težine infektivnog oboljenja i karakteristika bolesnika (11).

U ovom istraživanju osetljivost na aztreonam utvrđena je kod 4,6% izolata, među kojima je 60% svih *Providencia* spp. i 100% *P. mirabilis* CPE izolata. Ovakav rezultat je u skladu sa činjenicom da su kod ovih izolata detektovane MBL (VIM), za koje aztreonam nije odgovarajući supstrat (11). S obzirom na to da su ove vrste urođeno rezistentne na antibiotike koji se koriste u terapiji infekcija izazvanih MDR CPE (kolistin, fosfomicin, tigeciklin), kao i zbog činjenice da su kod ovih izolata detektovane MBL, na koje ne deluju nove kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza (ceftazidim-avibaktam i meropenem-vaborbaktam), aztreonam može predstavljati alternativnu terapiju za infekcije izazvane ovim sojevima bakterija (138,139). Međutim, iako se aztreonam preporučuje u terapiji CPE (MBL i/ili *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivnih sojeva), ne bi ga trebalo davati kao monoterapiju, kao ni za ESBL i AmpC pozitivne izolate (139).

Osetljivost na hloramfenikol utvrđena je kod 34% vanbolničkih CPE, te ovaj antibiotik spada u antimikrobne agense sa najvećom stopom osetljivosti kod testiranih izolata. Iako je prema nekim istraživanjima hloramfenikol alternativna terapija za infekcije izazvane MDR sojevima enetrobakterija, za njegovu primenu u lečenju infekcija izazvanih CPE nema dovoljno naučnih dokaza (140).

U našoj studiji rezistenciju na gentamicin imalo je 84,7 %, a na amikacin 68,1% vanbolničkih CPE izolata. Slične rezultate dobili su Trudić i sar. kod bolničkih multirezistentnih izolata *K. pneumoniae* i *E. coli* u Srbiji (rezistencija na gentamicin kod 89,1%, na amikacin kod 33,3% izolata) (61). Aktuelni terapijski protokoli za MDR CPE preporučuju kombinovanje aminoglikozida sa karbapenemima ili inhibitorima sinteze proteina (npr. sa tigeciklinom), sa kojima pokazuju sinergistički efekat (olakšavaju ulazak u ćeliju, smanjuju ekspresiju beta-laktamaza) (141). Međutim, visoka stopa rezistencije na aminoglikozide u Srbiji ograničava njihovu primenu u terapiji. Sa druge strane, pokazano je da izolati kategorizovani kao osetljivi imaju MIK za aminoglikozide blizu graničnih vrednosti, te je, da bi se postigla terapijska efikasnost, potrebno praktično individualno doziranje, uglavnom visokim dozama leka (141,142). Ovo potvrđuju i rezultati u našem istraživanju, u kojem su CPE izolati *E. cloacae/asburiae* osetljivi na amikacin imali MIK 4 mg/l ili 8 mg/l (granična vrednost MIK za amikacin je 8 mg/l, 49). Rezistencija na aminoglikozide kod CPE može se objasniti čestom udruženošću gena za aminoglikozid-modifikujuće enzime (AME) i gena za beta-laktamaze na istom plazmidu (9,25,142,143). Na plazmidu pSRB\_OXA-48, okarakterisanom kod izolata iz ove studije, dokazani su *aac(6')-Ib-cr* i *aac(3')-IIa* AME geni. Ovo su najčešći geni opisani u studijama u Španiji, Poljskoj i Norveškoj (144), i među najčešćim u Grčkoj (145). Podaci o AME tipovima gena u Srbiji su oskudni. Lilić i sar. su detektovali *aac(6')-Ib-cr* kod *Achromobacter xylosoxidans* izolata (146). *aac(6')-Ib-cr* gen je varijanta AME koja je odgovorna i za rezistenciju na fluorohinolone (ciprofloksacin i norfloksacin) (146,147). Pored navedenih, WGS izolata iz ove studije pokazao je prisustvo i drugih gena za rezistenciju na aminoglikozide: *aac-*, *aad-*, *aph-* i *ant-* tipove AME, kao i *armA* gen (16s RNK metilaza) kod dva izolata, koji je odgovoran za rezistenciju visokog nivoa na aminoglikozide.

Ispitivanje osetljivosti na tigeciklin rađeno je u automatizovanom sistemu VITEK 2 za CPE izolate *E. cloacae/asburiae*. U skladu sa EUCAST preporukama za interpretaciju osetljivosti na tigeciklin ([https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/guidance\\_documents](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents)), većina izolata (94,1%) pripada „wild type”, odnosno fenotipski nisu detektovani mehanizmi

stečene rezistencije Prema epidemiološkim podacima na globalnom nivou, zastupljenost rezistencije na tigeciklin kod CPE je manja od 20%, stoga se može zaključiti da učestalost izolata sa detektovanom stečenom rezistencijom dobijena u ovom istraživanju (5,9%) ne odstupa od nivoa u drugim zemljama (12). Potrebno je istaći da vrednosti MIK zavise direktno od metode testiranja, i u odnosu na BMD kao referentnu metodu, MIK dobijene u VITEK 2 sistemu su više, odnosno veći procenat izolata pokazuje smanjenu osetljivost na tigeciklin (12). Stoga bi za pravilnu interpretaciju vrednosti MIK ipak bilo neophodno rezultate potvrditi referentnom metodom.

U našem istraživanju rezistenciju na ertapenem pokazalo je 100% CPE izolata, na meropenem 93,8% i na imipenem 71,5% izolata. Utvrđena je statistički značajna razlika u rezistenciji na karbapeneme kod izolata sa dokazanim genima za karbapenemaze u odnosu na izolate kod kojih geni nisu dokazani, i to za ertapenem i meropenem ( $p < 0,001$ ). Poznato je da bakterije koje imaju gene za karbapenemaze ne moraju biti fenotipski rezistentne na karbapeneme, zbog niskog nivoa ekspresije ovih gena, posebno *bla*<sub>OXA-48-like</sub> pozitivni sojevi (11,148). Ipak, iako je većina izolata iz ove studije imala *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gen, fenotipska rezistencija na karbapeneme bila je izražena. Glavni razlog je udruženost OXA-48 karbapenemaza sa drugim mehanizmima rezistencije (26). WGS analiza je kod svih studijskih izolata detektovala *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gen (ESBL tip enzima), kao i mutaciju *ompK35* gena za glavni protein spoljašnje membrane koja dovodi do gubitka propustljivosti za cefamicine i ertapenem. Sa druge strane, *bla*<sub>KPC</sub> pozitivni izolati pokazali su rezistenciju na sve karbapeneme od 100%, što je uobičajeno kod KPC produkujućih sojeva (24).

Kod CPE izolata iz ove studije utvrđena je statistički značajno veća učestalost I fenotipa osetljivosti na imipenem ( $p < 0,05$ ) u odnosu na izolate kod kojih geni nisu nađeni. Ovakvom rezultatu doprinosi činjenica da svi izolati sa *bla*<sub>VIM</sub> genom u našem istraživanju pripadaju porodici *Morganellaceae*, čiji članovi pokazuju urođeno nizak nivo rezistencije na imipenem posredovan izmenama PVP2, odnosno I fenotip (148). Međutim, udruženost I fenotipa osetljivosti je bila najizraženije kod izolata sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genom ( $p < 0,001$ ), što je i očekivano, jer OXA-48 enzimi često ispoljavaju slabiju hidrolitičku aktivnost u odnosu na ostale tipove karbapenemaza. Nasuprot ovome, osetljivost na meropenem je bila niska, to jest skoro 95% izolata je bilo rezistentno, što je rezultat koji potvrđuje optimalnu specifičnost i senzitivnost ovog karbapenema za laboratorijsku detekciju karbapenemaza.

Različita istraživanja su istakla važnost određivanja tipa karbapenemaze prilikom odabira terapijskih protokola, kako baziranih na primeni karbapenema u terapiji infekcija izazvanih CPE, tako i za primenu novih kombinacija beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza (ceftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-relebaktam) (11,149). Većina studija koja je potvrdila efikasnost primene meropenema u terapiji CPE odnosila se na KPC produkujuće izolate, dok ispitivanja za MBL ili OXA-48 pozitivne izolate nisu dala ohrabrujuće rezultate (11,149). Korelacija za nosioce *bla*<sub>NDM</sub> gena je bolja, jer dokazi upućuju na manju *in vivo* efikasnost NDM-1 varijante enzima, zbog slabijeg sticanja Zn<sup>2+</sup> jona neophodnih za ispoljavanje hidrolitičke aktivnosti. Sa druge strane, novije varijante NDM enzima (NDM 2-14) imaju viši afinitet za Zn<sup>2+</sup> jone i bolju *in vivo* efikasnost. Može se zaključiti da je neophodno utvrditi i tačnu varijantu gena za karbapenemaze, zbog implikacija u terapiji CPE (149). Ovo potvrđuju i varijante KPC enzima detektovane tokom terapije ceftazidim-avibaktamom, koje su rezistentne na ovaj antibiotik, ali ne i na druge, novije kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza (meropenem-vaborbaktam, imipenem-relebaktam) (149).

Jedan od najvažnijih antibiotika za terapiju infekcija uzrokovanih CPE je kolistin (polimiksin E). Uglavnom se daje kao kombinovana terapija sa karbapenemima, tigeciklinom, aminoglikozidima i fosfomicinom, radi povećanja efikasnosti (11). Poslednjih godina evidentan je porast rezistencije na kolistin, što je očekivano, zbog intenzivnijeg korišćenja kolistina u lečenju, ali značajno ograničava terapijske opcije i povećava smrtnost od infekcija (149).

Kod vanbolničkih CPE na teritoriji Beograda, rezistencija na kolistin utvrđena je kod 23,4% (95% CI 16,6-31,3%) izolata, isključivo kod *K. pneumoniae*. Prva studija kolistin-rezistentnih karbapenemaza-produkujućih izolata *K. pneumoniae* u Srbiji, koju su Novović i sar. sprovedi u periodu 2013-2016. godine, odnosila se na molekularnu epidemiologiju kolistin-rezistentnih izolata, ali nije određivana njihova učestalost (63). Trudić i sar. su u svojoj studiji bolničkih CRE rezistenciju na kolistin utvrdili kod 5,1% izolata (61). Najnovija studija bolničkih infekcija, na odeljenju intenzivne nege u bolnici tercijarnog nivoa u Beogradu, pokazala je da je 26% izolata *K. pneumoniae* rezistentno na kolistin (150).

Najveći broj istraživanja u kojima se mogu naći podaci o učestalosti rezistencije na kolistin kod enterobakterija odnose se na izolate iz uzoraka bolničkih pacijenata. Uočava se trend povećanja broja kolistin-rezistentnih CPE poslednjih nekoliko godina, što se može povezati sa učestalijom primenom kolistina u terapiji infekcija izazvanih MDR i XDR sojevima. Popović i sar. su pokazali pozitivnu korelaciju između potrošnje antibiotika i pojave rezistencije, posebno izraženu za karbapeneme i kolistin, sa učestalošću kolistin-rezistentne *K. pneumoniae* od 40% u bolnici u Novom Sadu, Srbija, u kojoj je studija rađena (151). U Turskoj je došlo do značajnog skoka stope rezistencije na kolistin kod CPE *K. pneumoniae* između 2013. i 2016. godine, sa 6% na 27,5%, dok je u jednoj studiji čak 75,6% ispitivanih izolata bilo rezistentno (152). Sličan trend opisan je u Grčkoj, gde je stopa rezistencije na kolistin kod *K. pneumoniae* sa 3,5% 2010. godine porasla na 21,9% u studiji sprovedenoj u periodu 2014-2017. godine (153). U istoj studiji utvrđena je značajna povezanost rezistencije na kolistin sa produkcijom karbapenemaza. U Brazilu je takođe pokazan porast stope rezistencije na kolistin kod *K. pneumoniae*, sa 1,8% 2006. godine, preko 15% 2013., do 27,1% 2015. godine (154). Italijanska studija rađena 2010-2011. godine utvrdila je visoku stopu kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* od 36,1% (155). Podaci iz različitih studija u drugim delovima sveta pokazuju učestalost od 0,4% u Tunisu, 4,0% na Tajvanu, 8,8% u Egiptu i 13% u SAD (156-159). Među malobrojnim istraživanjima rezistencije na kolistin na teritoriji Balkana je i istraživanje koje je obuhvatilo nekoliko bolnica u Hrvatskoj u periodu 2013-2018. godine, gde se stopa rezistencije na kolistin kod enterobakterija kretala od 0,007% do 0,25% (160).

U našem istraživanju rezistencija na kolistin detektovana je isključivo kod *K. pneumoniae*, ali ne i kod drugih vrsta CPE. Najčešći gen za karbapenemaze, kod 91% kolistin-rezistentnih izolata, bio je *bla<sub>OXA-48-like</sub>*. Po jedan izolat (po 3%) imao je *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, odnosno *bla<sub>KPC</sub>* i *bla<sub>NDM</sub>* gene. U prethodno navedenoj studiji o kolistin-rezistentnim izolatima *K. pneumoniae* u Srbiji, takođe je najčešća karbapenemaza bila OXA-48 (63). Očekivano, kada se analiziraju rezultati istraživanja u svetu, tip karbapenemaze koji je najčešće udružen sa rezistencijom na kolistin odgovara epidemiološkim podacima o određenom geografskom regionu. U područjima koja su endemska za OXA-48 tip, kao što je Turska, ovo jeste najčešća karbapenemaza kod kolistin-rezistentnih izolata (152). Ovakav rezultat dobijen je i u Hrvatskoj (160). U Grčkoj je najzastupljenija KPC (40,3%), a zatim VIM (14,2%) karbapenemaza (153), što je rezultat sličan onom u Italijanskoj studiji (155), i u skladu je sa činjenicom da su Mediteranske zemlje jedan od rezervoara za *bla<sub>KPC</sub>* i *bla<sub>VIM</sub>* gene. Poznato je

da je američki kontinent endemski za KPC karbapenemaze, što je i pokazano u Brazilu i SAD, gde je ovaj tip enzima najčešći kod kolistin-rezistentnih izolata (156,159).

Laboratorijska detekcija molekularnih mehanizama rezistencije na kolistin je složena, s obzirom na to da postoji veliki broj varijanti i podvarijanti plazmidskog *mcr* gena, ali je i utvrđivanje mutacija na hromozomskim genima odgovornim za kolistinsku rezistenciju podjednako zahtevno. Izražen diverzitet mutacija otežava standardno molekularno testiranje, jer se nove varijante gena ne mogu otkriti uobičajenim metodama. Imajući u vidu da je krajnji rezultat svih mutacija modifikacija lipida A, određivanje upravo ovih specifičnih izmena ima veliki potencijal u otkrivanju rezistencije na kolistin. Jedan od mogućih načina je i primena MALDI-TOF MS, kojom su analizirani lipidi A izolata iz naše studije. U masenom spektru kolistin-rezistentnih izolata detektovan je dodatni pik od 1971 m/z u odnosu na maseni spektar referentnog, kolistin-senzitivnog soja *K. pneumoniae*. Promena odgovara modifikaciji lipida A posredovanoj mutacijama hromozomskog *pmrHFIJKLM* operona, koja za posledicu ima rezistenciju na kolistin. Istovremeno, promene koje bi odgovarale modifikacijama nastalim zbog prisustva *mcr* gena nisu nađene. Dortet i sar. su razvili test baziran na MALDI-TOF MS analizi lipida A (MALDIxin test) (161). Primenom ove metode uspešno su dokazali pojavu dodatnog pika od 1971 m/z u masenom spektru kod kolistin-rezistentnih *K. pneumoniae* sa prethodno utvrđenim hromozomskim mutacijama, dok su kod *mcr* pozitivnih izolata detektovali pikove na 1963 m/z i 2201 m/z. Slični rezultati dobijeni su u još nekoliko studija, u kojima je uspešno primenjena MALDI-TOF MS za detekciju kolistin-rezistentnih izolata kod *E. coli* i *Salmonella* spp. (162-164). Navedenom metodom moguće je razlikovati izolate sa *mcr* genima od onih sa hromozomskim mutacijama odgovornim za rezistenciju na kolistin, što ima veliki epidemiološki značaj. U kratkom roku, za manje od 15 min, može se analizirati veliki broj uzoraka, te bi ova metoda bila pogodna za skrining u okviru sistematskog nadzora nad kolistinskom rezistencijom (162,163). Specifičnost analize jeste detekcija masenih spektara u modu sa negativnim jonima, što još uvek nije uobičajeni način korišćenja aparata, i zahteva dodatnu optimizaciju metode u cilju rutinske primene (161).

Nakon što je 2016. godine dokazana rezistencija na kolistin posredovana genima na plazmidu, velika pažnja usmerena je na njenu detekciju i praćenje na globalnom nivou. Za uspešnu kontrolu širenja potrebna je efikasna strategija bazirana na utvrđivanju fenotipske rezistencije na kolistin odgovarajućim laboratorijskim metodama, detekciji mehanizama rezistencije, kao i na utvrđivanju klonalne povezanosti i distribucije rezistentnih sojeva, posebno kod MDR enterobakterija (44). Detaljan uvid u sve genetske strukture u bakterijskoj ćeliji, koji omogućava detekciju kako poznatih, tako i novih markera rezistencije, daje najsavremenija molekularna metoda - WGS.

U ovoj studiji, WGS analizom obuhvaćeno je 17 kolistin-rezistentnih vanbolničkih CPE izolata *K. pneumoniae*. U cilju određivanja mehanizama rezistencije na kolistin posredovane plazmidom rađena je detekcija *mcr* 1-5, ali ovi geni nisu nađeni. U studiji Novović i sar., koja je obuhvatila kolistin-rezistentne izolate iz Srbije u periodu 2013-2016. godine, takođe nije utvrđeno postojanje *mcr*-1 i *mcr*-2 gena (63). Na globalnom nivou, zastupljenost *mcr* gena kod *K. pneumoniae* je mala, i u ukupnom broju *mcr* pozitivnih izolata iznosi oko 2%. (165). Najveća zastupljenost je kod *E. coli* (91%) i *Salmonella* spp. (7%), što se može objasniti činjenicom da se ove bakterije, kao izazivači infekcija koje se prenose hranom, najčešće analiziraju na prisustvo *mcr* gena, čak 12 puta češće od *K. pneumoniae*. Sa druge strane, u velikom broju studija, skrining na prisustvo *mcr* gena rađen je kod MDR izolata *K. pneumoniae*, sa beta-laktamazama ili sa fenotipskom rezistencijom na kolistin, što utiče na procenu zastupljenosti, odnosno može podceniti stopu *mcr* pozitivnih izolata (165). Do danas je otkriveno 10 varijanti

*mcr* gena, a kod *K. pneumoniae* detektovane su varijante *mcr-1*, *mcr-3*, zatim *mcr-7* i *mcr-8* isključivo kod ove vrste u Aziji, kao i najnovija varijanta *mcr-9*, koja je posle *mcr-1* najrasprostranjenija u svetu (166-168). Retrospektivnom analizom 1717 genoma bolničkih izolata *K. pneumoniae* iz velike evropske studije (53), sprovedene 2013-2014. godine, *mcr-9* varijanta gena detektovana je kod 28 izolata, među kojima je i jedan izolat iz Srbije (16). Radi se o bolničkom izolatu, uzročniku urinarne infekcije, kod kojeg je potvrđena i NDM-1 karbapenemaza. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu za stalnim nadzorom nad plazmidski posredovanom rezistencijom na kolistin, kako u prospektivnim, tako i u retrospektivnim studijama, radi boljeg razumevanja puteva transmisije *mcr* gena i kontrole njegovog širenja, što je i preporuka ECDC iz 2016. godine (44).

Rezistencija na kolistin kod *K. pneumoniae* uglavnom je posredovana mutacijama hromozomskih gena. Kod svih ispitanih kolistin-rezistentnih studijskih izolata utvrđene su mutacije u PhoP/PhoQ regulatornom sistemu hromozomskog *mgrB* gena, i to po tipu SNPs. Najčešća (94,1%) je bila supstitucija Cys→Ser na poziciji 28 (MgrB<sup>C28S</sup>). Detektovana je još jedna mutacija, MgrB<sup>K3\*</sup> kod jednog (5,9%) izolata, koja dovodi do prevremenog stop kodona.

Supstitucija MgrB<sup>C28S</sup> je prvi put detektovana upravo kod izolata iz ove studije. Lippa i sar. su u svom istraživanju pokazali ulogu supstitucije cisteina na poziciji 28 u rezistenciji na kolistin (170). Ova aminokiselina gradi disulfidnu vezu koja je ključna za funkciju MgrB proteina, i bilo koja supstitucija utiče na njegovu aktivnost u represiji *PhoQ* gena. Derepresija *PhoQ* gena, koji je deo dvokomponentnog *PhoPQ* sistema, dovodi do fosforilacije i aktivacije *PhoP* komponente, što za posledicu ima prekomernu ekspresiju *pmrHFIJKLM* operona. Ovaj operon kodira enzime odgovorne za dodavanje LAra4N na lipid A, dolazi do modifikacija, koje za posledicu imaju rezistenciju na kolistin (171). Sličan mehanizam, sa supstitucijom cisteina tirozinom (MgrB<sup>C28Y</sup>), utvrdili su Cheng i sar. kod *K. pneumoniae* izolata u Tajvanu (172). Važno je istaći da postoje različite alteracije *mgrB* gena sa sličnim efektom. Najčešće su to insercije različitih sekvenci, zatim delecije manjih ili većih segmenata, kao i prethodno navedene supstitucije (171,173-177). Na primer, kod bolničkih kolistin-rezistentnih, KPC-produkujućih izolata *K. pneumoniae* iz Italije i Grčke, 53% izolata je imalo mutacije *mgrB* gena, od toga kod dve trećine su utvrđene insercije IS5-like, IS1F-like ili ISKpn14 sekvenci, dok je kod oko trećine izolata utvrđena delecija koja je dovela do inaktivacije MgrB proteina (173). Slični rezultati dobijeni su i u Brazilu, gde su kod većine testiranih izolata utvrđene insercije u sekvencu *mgrB* gena (174). Sličan rezultat dobili su Shamina i sar. u Moskvi, Rusija, ali je kod izolata *K. pneumoniae* iz njihove studije, za razliku od prethodno navedenih, većina izolata (92%) imala bla<sub>OXA-48</sub> gen (177).

U našem istraživanju detektovana je i mutacija koja je rezultovala prevremenim stop kodonom (MgrB<sup>K3\*</sup>), i koja je u literaturi opisana kao jedan od mehanizama inaktivacije MgrB proteina (175). U prvoj studiji u kojoj su analizirani kolistin-rezistentni izolati iz Srbije utvrđena je alteracija *mgrB* gena u vidu insercije ISKpn26, kao i prevremeni stop kodon, ali supstitucije nisu nađene (63). Potrebno je istaći da je kao referentni genom u navedenoj studiji korišćen kolstin-senzitivni klinički izolat (178), koji nije okarakterisan referentnom metodom za određivanje mehanizama rezistencije na kolistin, što ističe važnost odabira referentnog genoma u molekularnim analizama u cilju reproducibilnosti rezultata.

Molekularna epidemiologija vanbolničkih kolistin-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* rađena je *in silico* MLST analizom. Detektovana su dva klona, ST437 kod 6%, i ST101 kod 94% izolata. ST437 pripada CG258, najzastupljenijoj u Evropi, koja se raširila iz SAD, posebno u Mediteranskim zemljama, i najodgovornija je za epidemiju CPE u prethodnih 15 godina u Evropi (38).



Dominantni klon u našem istraživanju bio je ST101. Zajednička filogenetska analiza studijskih vanbolničkih izolata sa bolničkim ST101 izolatima iz Srbije pokazala je srednju vrednost SNPs od 107 (medijana 61). Referentni kriterijumi za grupisanje izolata *K. pneumoniae* u klastere bazirano na SNPs nisu definisani. U brojnim istraživanjima koja su, pored podataka dobijenih genetskom analizom, obuhvatila i epidemiološke podatke, određene su *cut-off* vrednosti za epidemijske klonove. Tako su David i sar. utvrdili *cut-off* od 21 SNPs za klastere bolničkih epidemija (38). U Španskoj studiji izolati istog klastera pokazivali su do 29 SNPs razlike (179), dok su u Italijanskoj studiji sojevi sa manje od 21 SNPs svrstani u epidemijski klon (180). Ludden i sar. su koristili kriterijum od 50 SNPs (181). Iako se ne može tvrditi da vanbolnički izolati iz ove studije potiču od istog epidemijskog klona, oni pokazuju međusobnu povezanost, kao i povezanost sa bolničkim izolatima iz Srbije, što ukazuje na moguću diseminaciju bolničkih kolistin-rezistentnih izolata u vanbolničku populaciju.

Poređenje studijskih izolata sa 195 genoma *K. pneumoniae* koji pripadaju ST101 iz NCBI baze, pokazalo je grupisanje u isti klaster sa izolatima iz Srbije, Slovenije, Turske i Grčke. Ludden i sar. su takođe utvrdili grupisanje izolata iz Srbije i Slovenije u jedinstveni klaster (181). I druga istraživanja su pokazala da je ST101, pre svega sa OXA-48 enzimom, dominantan u Mediteranskim zemljama, i da je zbog velikog potencijala širenja došlo do njegove ekspanzije i u drugim regionima Evrope, Severne Afrike i Bliskog Istoka (26,27,38,182).

Svi karbapenemaza-produkujući ST101 vanbolnički izolati iz naše studije imali su OXA-48 karbapenemazu. Na povezanost kolistin-rezistentnih izolata sa određenim tipom karbapenemaza utiče geografska distribucija ovih enzima. Tako je u Turskoj 81% ST101 izolata imalo *bla*<sub>OXA-48</sub> gen, dok je u Italiji najčešći tip bio *bla*<sub>KPC-2</sub> (182,183). ST101 klon je prvi put kod izolata iz Srbije utvrđen 2013. godine, kod *K. pneumoniae* sa koprodukcijom OXA-48 i NDM karbapenemaza (184). U studiji Novović i sar., 44,44% bolničkih kolistin-rezistentnih izolata iz Srbije pripadalo je ST101, i svi su imali *bla*<sub>OXA-48</sub> gen (63). Evropska studija CPE rađena u periodu 2013-2014. godine, pokazala je da je došlo do širenja malog broja karbapenemaza-produkujućih klonova bolničkog porekla, među kojima je posebno izražena ekspanzija ST101 (38). Dodatno zabrinjava činjenica da je ST101 povezan sa visokim rizikom od smrtnosti, većim za 11% u odnosu na „*non*-ST101“ izolate (182,183). Povećan rizik se povezuje sa brojnim faktorima virulencije prisutnim kod ovih izolata (geni za siderofore, jersinijabaktin, manoza-rezistentne *Klebsiella*-like fimbrije tipa III i druge), kao i sa genima rezistencije na različite klase antibiotika, uključujući i karbapeneme (182).

Može se zaključiti da ST101 predstavlja globalnu pretnju usled sve intenzivnijeg širenja. S obzirom na to da je povećan rizik od oboljevanja i smrtnosti povezan sa ovim klonom, te da su gotovo svi analizirani vanbolnički kolistin-rezistentni izolati iz ove studije pripadali ST101, neophodna je pravovremena detekcija visoko rizičnih klonova radi sprečavanja širenja i pojave epidemija.

WGS analiza je pokazala da su svi kolistin-rezistentni karbapenemaza-pozitivni izolati *K. pneumoniae* iz našeg istraživanja imali *bla*<sub>OXA-48</sub> gen, za čiju je diseminaciju kod enterobakterija odgovoran IncL/M-like konjugativni plazmid (185). Stoga je rađena detekcija IncL/M-like plazmida PlasmidFinder alatkom. Kod pripadnika ST437 utvrđen je ovaj tip plazmida, dok kod ST101 izolata nije nađen nijedan replikon. Radi detekcije odgovarajućeg nosioca *bla*<sub>OXA-48</sub> gena, WGS podaci dobijeni *short reads* sekvenciranjem analizirani su zajedno sa *long reads* sekvencama reprezentativnog ST101 izolata (No. 1707139). Detektovan je novi plazmid, od 83.654 bp, prvi put opisan u ovom istraživanju, nazvan pSRB\_OXA-48. Radi se o

hibridnom plazmidu, koji je nastao rekombinacijom IncFIA-IncR pKp\_Goe\_641-1 (CP018737.1), sa kojim pokazuje 99,7% sličnosti, i na kome se nalaze geni rezistencije za različite klase antibiotika, i fragmenta IncL/M tipa plazmida pKp\_Goe\_641-2 (CP018736.1), koji je nosilac *bla*<sub>OXA-48</sub> gena. Ova dva plazmida su opisana kod izolata *K. pneumoniae* pacijenta iz Severne Afrike, hospitalizovanog u Nemačkoj 2013. godine (Kp\_Goe\_121641, accession no. NZ\_CP018735.1). Navedeni izolat pripada ST101, i pokazuje medijanu od 142 SNPs u odnosu na ST101 studijske izolate. Detaljna analiza pSRB\_OXA-48 pokazala je prisustvo izmenjene kopije Tn6237, u kome se nalazi kompozitni transpozon IS26 od 73,7 Kbp sa dupliranim sekvencama od 8 bp na krajevima. pKp\_Goe\_641-1 sadrži ovakav kompozitni transpozon, dok pKp\_Goe\_641-2 sadrži intaktni Tn6237. Rekombinacijom je nastao pSRB\_OXA-48, sa izmenjenim Tn6237, čime se objašnjava poreklo novog, hibridnog plazmida. Pored *bla*<sub>OXA-48</sub> gena, ovaj plazmid sadrži gene i za druge beta-laktamaze, i to ESBL *bla*<sub>CTX-M-15</sub> tipa, *bla*<sub>OXA-1</sub>, kao i gene za rezistenciju na tetracikline, aminoglikozide, fluorohinolone, fenikole i trimetoprim, odnosno pokazuje MDR profil.

Kod svih ST101/*bla*<sub>OXA-48</sub> izolata iz ovog istraživanja potvrđen je pSRB\_OXA-48. Prvi put *bla*<sub>OXA-48</sub> gen na plazmidu kod *K. pneumoniae* nađen je 2004. godine (186). Ovaj plazmid je kasnije okarakterisan, i pripadao je IncL/M tipu pOXA-48-like plazmida (187). Pokazana je njegova izuzetna sposobnost transmisije, kako unutar jedne vrste, tako i između različitih vrsta bakterija, što objašnjava rasprostranjenost i dominaciju širom Evrope (185,188). David i sar. su u svom istraživanju utvrdili povezanost *bla*<sub>OXA-48</sub> gena i pOXA-48-like plazmida, kao i da se *bla*<sub>OXA-48</sub> gen nalazi u okviru kompozitnog transpozona Tn6237 (185). Takođe su dokazali pOXA-48-like plazmid kod 37 različitih STs, a posebno klonalnu diseminaciju visoko rizičnih klonova ST11, ST15, ST101 i ST258/512 širom Evrope (185).

Rezultati naše studije pokazuju da postoji klonalna povezanost i klonalna distribucija vanbolničkih CPE na teritoriji Beograda. Dodatna analiza kolistin-rezistentnih CPE pokazuje takođe klonalnu povezanost ovih najrezistentnijih vanbolničkih izolata, kao i njihovu povezanost sa bolničkim izolatima iz Srbije, uz dominaciju visoko rizičnog klona ST101. Može se zaključiti da vanbolnička populacija predstavlja značajan rezervoar antimikrobne rezistencije, i da je brza, pravovremena detekcija nosilaca CPE neophodna, u cilju kontrole širenja rezistencije i sprečavanja pojave epidemija.

Identifikacija CPE nosilaca je posebno važna u područjima koja su endemska za karbapenemaze (79), kao što je naša zemlja, ali nije jednostavno odrediti način utvrđivanja nosilaca, bilo da se radi o kolonizaciji ili o infekciji izazvanoj CPE. Većina istraživanja u vezi sa detekcijom CPE nosilaca odnosila se na skrining prilikom hospitalizacije. Rezultati su pokazali da aktivni skrining svih pacijenata na prijemu u bolnicu značajno doprinosi kontroli širenja CPE, i da je ekonomski opravdan (79,80,190). Za procenu odnosa troškova i efekata (engl. *cost effectiveness*) potrebno je znati učestalost CPE u ispitivanoj populaciji. Povoljan odnos troškova i efekata, kao i značajne uštede (engl. *cost saving*), postižu se ukoliko je učestalost CPE 0,3% ili veća (190), što je rezultat dobijen u ovom istraživanju (0,34%). Može se zaključiti da bi uvođenje aktivnog skrininga CPE nosilaca na prijemu u bolnicu imalo povoljne epidemiološke i ekonomske efekte.

Sa druge strane, aktuelni vodiči ne podržavaju aktivni skrining CPE u vanbolničkoj populaciji, ali ipak preporučuju procenu rizika od širenja CPE u određenoj vanbolničkoj sredini (80). Procena je bazirana pre svega na učestalosti CPE u datoj populaciji, karakteristikama pacijenata, nivoa zdravstvene zaštite, stopi potrošnje karbapenema (80,190). Kao što je prethodno navedeno, u našoj zemlji postoji visoka učestalost CPE, posebno u bolnicama koje su nalaze u blizini ustanova primarne zdravstvene zaštite na

teritoriji Beograda (53), a pokazana je i diseminacija CPE između različitih zdravstvenih ustanova (56). Takođe, u našoj zemlji postoji visoka stopa potrošnje antibiotika, posebno karbapenema (81). Sve navedeno jasno ukazuje na važnost ciljne mikrobiološke detekcije i praćenja CPE u vanbolničkoj populaciji na teritoriji Beograda.

Registrowanje i praćenje CPE bazira se na laboratorijskoj detekciji indikatora antimikrobne rezistencije (80,190). U cilju registrovanja i praćenja CPE prihvatljivim minimumom smatra se utvrđivanje rezistencije na karbapeneme, a kao ključni marker preporučuje se detekcija karbapenemaza, zbog izuzetno velikog potencijala vertikalne i horizontalne transmisije gena za ove enzime (80). Rezultati koji su dobijeni u našem istraživanju pokazali su da izolati sa dokazanim genima za karbapenemaze pokazuju statistički značajno veću stopu rezistencije na karbapeneme u odnosu na izolate kod kojih ovi geni nisu nađeni. Takođe, naša studija je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u detekciji karbapenemaza fenotipskom metodom (skrining na produkciju karbapenemaza diskom meropenema) u odnosu na „zlatni standard“, odnosno detekciju gena za karbapenemaze. Stoga se za laboratorijsku detekciju CPE u rutinskom radu može preporučiti skrining diskom meropenema (28), zbog jednostavnosti metode, primenljive u svim mikrobiološkim laboratorijama.

Prilikom opredeljivanja za odgovarajući laboratorijski metod za detekciju CPE, potrebno je uzeti u obzir i hitnost detekcije CPE izolata, u cilju pravovremene primene preventivnih mera i sprečavanja pojave epidemija. Obrtno vreme detekcije CPE je kritični faktor za transmisiju, stoga bi trebalo u laboratorijske algoritme uvrstiti i neke od fenotipskih testova za brzu detekciju karbapenemaza, kao što su kolorimetrijski Carba-NP test, imunohromatografski testovi i slično (191).

Ograničenja u smislu vremena dobijanja rezultata prevazilaze se primenom molekularnih metoda, koje su danas nezamenljive kada je u pitanju praćenje i kontrola širenja antimikrobne rezistencije. U odnosu na lokalnu epidemiološku situaciju, odnosno zastupljenost određenih tipova karbapenemaza, odabiraju se specifični geni koji se prate, a prema rezultatima ovog istraživanja to su *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>VIM</sub>. Detekcija gena metodama baziranim na PCR tehnici u rutinskom radu u mikrobiološkim laboratorijama povezana je sa brojnim teškoćama, posebno u zemljama sa ograničenim materijalnim resursima, kakva je Srbija. Ograničenja u pogledu tehničkih, materijalnih i ljudskih resursa zahtevaju osmišljavanje strategija i procedura primenljivih na nacionalnom nivou, pre svega u okviru nacionalnih referentnih laboratorija (190). S obzirom na to da sumnja na promene u antimikrobnoj rezistenciji zahteva promptno reagovanje, izuzetno je važno ažurno prikupljati, analizirati i intepretirati kako laboratorijske, tako i prateće epidemiološke podatke (190). Najlakši način je putem implementacije elektronskih sistema za prikupljanje podataka na lokalnom nivou, koji će omogućiti brzu procenu epidemiološke situacije i pravovremenu primenu mera za kontrolu širenja antimikrobne rezistencije.

## ***6. ZAKLJUČCI***

---

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Učestalost CPE u vanbolničkoj populaciji u Beogradu (0,34%) je značajno manja u odnosu na učestalost bolničkih CPE u Srbiji. Sa druge strane, nema razlike u zastupljenosti CPE u odnosu na vanbolničku populaciju u drugim evropskim zemljama. Ovaj rezultat je od izuzetnog značaja, s obzirom na to da Srbija spada u red zemalja sa najvećom učestalosti bolničkih CPE u Evropi.
2. Produkcija karbapenemaza je dominantni mehanizam rezistencije na karbapeneme kod vanbolničkih CPE izolata (80,4%). Karbapenemaza-pozitivni izolati detektovani su najčešće kod *K. pneumoniae* i *E. cloacae/asburiae*, i to kod 79%, odnosno 14% od ukupnog broja CPE. Kod najčešće izolovane enterobakterije, *E. coli*, utvrđena je produkcija karbapenemaza kod svega 0,01% izolata.
3. Zastupljenost tipova karbapenemaza kod vanbolničkih CPE značajno se razlikuje u odnosu na zastupljenost kod bolničkih izolata u Srbiji. Najčešća karbapenemaza kod vanbolničkih CPE bila je OXA-48-like (64%), slede NDM (21%), KPC (7%) i VIM (2%). Gene za dve karbapenemaze imalo je 5,6% izolata. Prvi put u ovom istraživanju opisani su izolati *K. pneumoniae* sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> i *bla*<sub>KPC</sub>, odnosno *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> kombinacijom gena, kao i izolati *E. cloacae/asburiae* i *E. coli* sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> kombinacijom gena.
4. Dominantna zastupljenost OXA-48 karbapenemaza kod izolata enterobakterija iz ove studije ukazuje na to da vanbolnička populacija u Beogradu predstavlja potencijalni rezervoar *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena.
5. Klonalna povezanost i klonalna distribucija dokazana je ERIC-PCR analizom vanbolničkih CPE. Od 26 klastera *K. pneumoniae*, u 10 klastera svrstano je 70,46% izolata, dok je 64,71% izolata *E. cloacae/asburiae* pripadalo klasterima 5 i 6. Utvrđena je udruženost između određenog klona i gena za karbapenemaze, i to: klastera 7 *K. pneumoniae* sa *bla*<sub>KPC</sub> ( $p < 0,001$ ); klastera 2, 6, 11, 13, 14, 17, 18 i 22 *K. pneumoniae* sa *bla*<sub>OXA-48-like</sub> ( $p < 0,05$ ); klastera 5 i 6 *E. cloacae/asburiae* sa *bla*<sub>NDM</sub> ( $p < 0,05$ ) i klastera 6 *E. cloacae/asburiae* sa *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genima ( $p < 0,05$ ).
6. Rezistenciju na kolistin imalo je 23,4 % vanbolničkih CPE, isključivo sojevi *K. pneumoniae*. WGS analizom kod svih izolata utvrđena je hromozomski posredovana rezistencija. Kod najvećeg broja izolata (94,1% ) rezultat je mutacije po tipu SNPs, i to supstitucije MgrBC<sup>28S</sup>, koja je prvi put detektovana u ovoj studiji.
7. Na osnovu *in silico* MLST analize, 94% kolistin-rezistentnih, OXA-48-produkujućih vanbolničkih izolata *K. pneumoniae* svrstano je u visoko rizični klon ST101, koji pokazuje ekspanziju na globalnom nivou. Vanbolnički izolati iz Beograda klonalno su povezani sa bolničkim ST101 izolatima iz Srbije, i pripadaju istom klasteru CG101, zajedno sa izolatima iz Slovenije, Turske i Grčke.
8. Ispitivanjem genomskog okruženja *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena utvrđeno je da se on nalazi na rekombinantnom konjugativnom plazmidu pSRB\_OXA-48, prvi put detektovanom u ovom istraživanju, što objašnjava izraženu diseminaciju *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gena u vanbolničkoj populaciji u Beogradu.

9. Izražena rezistencija na karbapeneme i učestalost vanbolničkih CPE izolata od 0,34% u Beogradu, kao i njihova klonalna distribucija, ukazuju na potrebu za ciljanom mikrobiološkom detekcijom i praćenjem CPE u vanbolničkoj populaciji. Za detekciju CPE može se preporučiti skrining na produkciju karbapenemaza diskom meropenema, a na nivou referentne laboratorije detekcija gena za karbapenemaze.

## ***7. LITERATURA***

---

1. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 8<sup>th</sup> ed. Elsevier Inc., 2014.
2. World Health Organisation. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. [citirano 08. januara 2020.]. Dostupno na: [www.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf).
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=91347>[citirano 08. januara 2020.].
4. Procop GW, Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA:Wolter Kluwer Health, 2017.
5. Savić B, Mitrović S, Jovanović T. Medicinska mikrobiologija: udžbenik za studente medicine. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta, CIBID, 2019.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
7. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):377-390.
8. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* 1965;208:239-241.
9. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ.* 2016;352:h6420.
10. Denton M. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29 Suppl 3:S9-S22.
11. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31:e00079-17.
12. Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(1):11-18.
13. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-195.
14. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(2):37.
15. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):337-418.
16. Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 2009;4(3):e4817.
17. Pavez M, Vieira C, de Araujo MR, Cerda A, de Almeida LM, Lincopan N, et al. Molecular mechanisms of membrane impermeability in clinical isolates of Enterobacteriaceae exposed to imipenem selective pressure. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(1):78-85.
18. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):659-667.
19. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
20. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455-78.
21. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriales: what a clinician should know. *Infection.* 2019;47(3):363-375.



22. van Boxtel R, Wattel AA, Arenas J, Goessens WH, Tommassen J. Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded-AmpC-Expressing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;61(1):e01413-16.
23. Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*. 2019;79(14):1529–1541.
24. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 2013;4:48.
25. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(1):7–16.
26. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(4):587–604.
27. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019;33(1):e00102-19.
28. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST 2017. Version 2.0. [citirano 23. marta 2020.]. Dostupno na: [www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms).
29. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother*. 2016;28(1):1–19.
30. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):432–438.
31. Miller S, Humphries RM. Clinical laboratory detection of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(8):705–717.
32. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11):e01140-18.
33. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:5.
34. Moloney E, Lee KW, Craig D, Allen AJ, Graziadio S, Power M, et al. A PCR-based diagnostic testing strategy to identify carbapenemase-producing Enterobacteriaceae carriers upon admission to UK hospitals: early economic modelling to assess costs and consequences. *Diagn Progn Res*. 2019;3:8.
35. Persing DH et al. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice* 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC: ASM Press. 2016.
36. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119–123.
37. Traczewski MM, Carretto E, Canton R, Moore NM. Multicenter Evaluation of the Xpert Carba-R Assay for Detection of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(8):e00272-18.
38. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919–1929.
39. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557-596.

40. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Appl Microbiol*. 2016;121(3):601-17.
41. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(3):415-420.
42. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;26;5:643.
43. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. Stockholm: ECDC. 2016.
45. Zurfluh K, Klumpp J, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Full-Length Nucleotide Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids Isolated from Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates of Different Origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(9):5589-91.
46. Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, et al. Complete Sequences of mcr-1-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4351-4.
47. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*. 2019;10(3):e00853-19.
48. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(8):865-870.
49. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints. [citirano 26. marta 2020.]. Dostupno na: [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).
50. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13 Suppl 3:1-46.
51. Pérez-Losada M, Arenas M, Castro-Nallar E. Microbial sequence typing in the genomic era. *Infect Genet Evol*. 2018;63:346-359.
52. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215:S28-S36.
53. European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:153-163.
54. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 4):499-513.
55. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249856.

56. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network EURGen-Net Capacity Survey Group. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(9):1900123.
57. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(2):127-134.
58. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Hoebeke M, Bauraing C, Glupczynski Y, on behalf of a multicentre study group. Increasing proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and emergence of a MCR-1 producer through a multicentric study among hospital-based and private laboratories in Belgium from September to November 2015. *Euro Surveill.* 2015;22:pii:30530.
59. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
60. CAESAR. Annual report 2016. Copenhagen: WHO regional office for Europe. [citirano 16. marta 2020.]. Dostupno na: [www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_/CAESAR-Annual-report-2016.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_/CAESAR-Annual-report-2016.pdf).
61. Trudić A, Jelesić Z, Mihajlović-Ukropina M, Medić D, Zivlak B, Gusman V, et al. Carbapenemase production in hospital isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Serbia. *Vojnosanit pregl.* 2017;74.8:715-721.
62. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 6.0 (January 2017) [citirano 28. marta 2020.]. Dostupno na: [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
63. Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D, et al. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(5):e02550-16.
64. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):128-132.
65. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):321-322.
66. Manchanda V, Rai S, Gupta S, Rautela RS, Chopra R, Rawat DS, et al. Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection of the newly emerging form of carbapenem resistance gene in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29(3):249-253.
67. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
68. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6823-6831.
69. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, et al. GelJ--a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:270.
70. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing

- Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3724–3732.
71. Kocsis B, Kilár A, Péter S, Dörnyei Á, Sándor V, Kilár F. Mass Spectrometry for Profiling LOS and Lipid A Structures from Whole-Cell Lysates: Directly from a Few Bacterial Colonies or from Liquid Broth Cultures. *Methods Mol Biol.* 2017;1600:187-198.
  72. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-477.
  73. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(6):e1005595.
  74. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* 2014;15(11):524.
  75. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W242-W245.
  76. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-3903.
  77. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics.* 2011;12:402.
  78. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics.* 2011;27(7):1009-1010.
  79. Lapointe-Shaw L, Voruganti T, Kohler P, Thein HH, Sander B, McGeer A. Cost-effectiveness analysis of universal screening for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hospital inpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(6):1047-1055.
  80. <https://www.gov.uk/government/publications/actions-to-contain-carbapenemase-producing-enterobacterales-cpe>. [citirano 28. oktobra. 2020.].
  81. Robertson J, Iwamoto K, Hoxha I, Ghazaryan L, Abilova V, Cvijanovic A, et al. Antimicrobial Medicines Consumption in Eastern Europe and Central Asia - An Updated Cross-National Study and Assessment of Quantitative Metrics for Policy Action. *Front Pharmacol.* 2019;9:1156.
  82. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); European Food Safety Authority (EFSA); European Medicines Agency (EMA). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA J.* 2017;15(7):e04872.
  83. Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, Ruiz Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Loeches Yagüe B, et al. Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(3):ofw136. Erratum in: *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(2):ofx119.
  84. Turnidge JD, Gottlieb T, Mitchell DH, Coombs GW, Daly DA, Bell JM. Australian Group on Antimicrobial Resistance. Community-onset Gram-negative Surveillance Program annual report, 2012. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2014;38(1):E54-8.
  85. van den Bunt G, van Pelt W, Hidalgo L, Scharringa J, de Greeff SC, Schürch AC, et al. Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-

- lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016. *Euro Surveill.* 2019;24(41):1800594.
86. Nüesch-Inderbinnen M, Zurfluh K, Hächler H, Stephan R. No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013;2:23.
  87. Henderson J, Ciesielczuk H, Nelson SM, Wilks M. Community prevalence of carbapenemase-producing organisms in East London. *J Hosp Infect.* 2019;103(2):142-146.
  88. Nicolas-Chanoine MH, Vigan M, Laouénan C, Robert J; "E-carb Study Group". Risk factors for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: a French case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(2):383-393.
  89. Mirovic V, Tomanovic B, Lepsanovic Z, Jovcic B, Kojic M. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase from the urine of an outpatient baby boy receiving antibiotic prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):6062-6063.
  90. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol.* 2019;10:44.
  91. Sepp E, Andreson R, Balode A, Bilozor A, Brauer A, Egorova S, et al. Phenotypic and Molecular Epidemiology of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe. *Front Microbiol.* 2019;10:2465.
  92. Abdallah M, Balshi A. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. *New Microbes New Infect.* 2018;25:16-23.
  93. Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, Mauri C, Nicchi J, Arena F, et al. Evolving beta-lactamase epidemiology in Enterobacteriaceae from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveill.* 2017;22(31):30583.
  94. Hu YY, Cai JC, Zhang R, Zhou HW, Sun Q, Chen GX. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring blaKPC-2 and qnrD in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2278-82.
  95. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Sekowska A, Gospodarek-Komkowska E, Hryniewicz W, et al. VIM/IMP carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(10):2675-2681.
  96. Ripabelli G, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Flocco R, Scutellà M, et al. Tracking Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian Hospital: Molecular Epidemiology and Surveillance by PFGE, RAPD and PCR-Based Resistance Genes Prevalence. *Curr Microbiol.* 2018;75(8):977-987.
  97. Toner G, Russell CD, Hamilton F, Templeton K, Laurenson IF. Phenotypic and molecular detection methods for carbapenemase-producing organisms and their clinical significance at two Scottish tertiary care hospitals. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):560-565.
  98. Sherry NL, Lane CR, Kwong JC, Schultz M, Sait M, Stevens K, et al. Genomics for Molecular Epidemiology and Detecting Transmission of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales in Victoria, Australia, 2012 to 2016. *J Clin Microbiol.* 2019;57(9):e00573-19.
  99. Mirović V, Carević B, Stepanović S, Lepšanić Z. An outbreak of infection due to metallo-beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* in the surgical intensive care unit. *Scr Med.* 2011;42:75-79.

100. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):467–471.
101. Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016;8(1):e2016032.
102. Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen MT, Poirel L, Nordmann P, Hächler H, Stephan R. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48  $\beta$ -lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015;4:9.
103. Woerther PL, Jardak T, Ben Hassine I, Forget S, Chachaty E, Arlet G, et al. A Long-Term Study of the Diversity of OXA-48-Like Carbapenemase-Producing Bacterial Strains in Infected Patients and Carriers. *Microb Drug Resist.* 2018;24(2):181-189.
104. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3929–3931.
105. Novovic K, Vasiljevic Z, Kuzmanovic M, Lozo J, Begovic J, Kojic M, et al. Novel *E. coli* ST5123 Containing bla<sub>NDM-1</sub> Carried by IncF Plasmid Isolated from a Pediatric Patient in Serbia. *Microb Drug Resist.* 2016;22(8):707–711.
106. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1730–1733.
107. Göttig S, Pfeifer Y, Wichelhaus TA, Zacharowski K, Bingold T, Averhoff B, et al. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):828–829.
108. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, et al. Molecular characterization of bla<sub>NDM-1</sub> in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):1998–2001.
109. Flateau C, Janvier F, Delacour H, Males S, Ficko C, Andriamanantena D, et al. Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. *Euro Surveill.* 2012;17(45):20311.
110. Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, Potron A, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. A case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2790–2791.
111. Gajamer VR, Bhattacharjee A, Paul D, Deshamukhya C, Singh AK, Pradhan N, et al. *Escherichia coli* encoding bla<sub>NDM-5</sub> associated with community-acquired urinary tract infections with unusual MIC creep-like phenomenon against imipenem. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;14:228-232.
112. Kim SY, Rhee JY, Shin SY, Ko KS. Characteristics of community-onset NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 1):86-89.
113. Nordmann P, Couard JP, Sansot D, Poirel L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin Infect Dis.* 2012;54(1):150-1.
114. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.
115. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873-84.

116. Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):136-9.
117. Vitti D, Protonotariou E, Sofianou D. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* carrying the blaVIM-1 gene in the community. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(2):187-8.
118. Mirza S, Jadhav S, Misra RN, Das NK. Coexistence of  $\beta$ -Lactamases in Community-Acquired Infections in a Tertiary Care Hospital in India. *Int J Microbiol.* 2019;2019:7019578.
119. Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1792-5.
120. Lalaoui R, Djukovic A, Bakour S, Hadjadj L, Sanz J, Salavert M, et al. Genomic characterization of *Citrobacter freundii* strains coproducing OXA-48 and VIM-1 carbapenemase enzymes isolated in leukemic patient in Spain. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:167.
121. Samuelsen Ø, Naseer U, Karah N, Lindemann PC, Kanestrøm A, Leegaard TM, et al. Identification of Enterobacteriaceae isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1682-5.
122. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):e00047-19.
123. Vannice K, Benoliel E, Kauber K, Brostrom-Smith C, Montgomery P, Kay M, et al. Notes from the Field: Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate with Three Carbapenem Resistance Genes Associated with Urology Procedures — King County, Washington, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019;68:667–668.
124. Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, et al. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol.* 2018;67(8):1031-1041.
125. Cirkovic I, Brkic S, Miljanovic D, Banko A, Lazarevic I, Bozic D. Wastewater and river waters are reservoirs of clinically relevant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. April 2019. Conference: ECCMID2019\_Amsterdam.
126. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J. European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(46):19716.
127. Azevedo PAA, Furlan JPR, Gonçalves GB, Gomes CN, Goulart RDS, Stehling EG, et al. A. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;18:74-79.
128. Oliveira ÉM, Beltrão EMB, Scavuzzi AML, Barros JF, Lopes ACS. High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with bla KPC and bla NDM from patients at a public hospital in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200397.
129. Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, Mauri C, Nicchi J, Arena F, et al. Evolving beta-lactamase epidemiology in Enterobacteriaceae from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveill.* 2017;22(31):30583.
130. Hu H, Mao J, Chen Y, Wang J, Zhang P, Jiang Y, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Community-Onset Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3131-3143.

131. Brañas P, Gil M, Villa J, Orellana MÁ, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infection/colonisation in a hospital in Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(2):100-103.
132. Lopes E, Saavedra MJ, Costa E, de Lencastre H, Poirel L, Aires-de-Sousa M. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:349-353.
133. Heinrichs A, Argudín MA, De Mendonça R, Deplano A, Roisin S, Dodémont M, et al. An Outpatient Clinic as a Potential Site of Transmission for an Outbreak of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 716: A Study Using Whole-genome Sequencing. *Clin Infect Dis*. 2019;68(6):993-1000.
134. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(6):1010-1019.
135. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:249856.
136. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol*. 2019;10:44.
137. Brkić S, Božić D, Stojanović N, Vitorović T, Topalov D, Jovanović M, et al. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp. Community Isolates in Belgrade, Serbia. *Microb Drug Resist*. 2020;26(4):378-384.
138. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health*. 2019;7:151.
139. Hawkey PM, Warren RE, Livermore DM, McNulty CAM, Enoch DA, Otter JA, et al. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(suppl\_3):iii2-iii78.
140. Eliakim-Raz N, Lador A, Leibovici-Weissman Y, Elbaz M, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):979-96.
141. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(6):519-526.
142. Haidar G, Alkroud A, Cheng S, Churilla TM, Churilla BM, Shields RK, et al. Association between the Presence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and In Vitro Activity of Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, and Plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- and Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacter* Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(9):5208-14.
143. Fernández-Martínez M, Ruiz Del Castillo B, Lecea-Cuello MJ, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez-Martínez L. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases Collected in Two Multicenter Studies in Spain. *Microb Drug Resist*. 2018;24(4):367-376.
144. Mancini S, Marchesi M, Imkamp F, Wagner K, Keller PM, Quiblier C, et al. Population-based inference of aminoglycoside resistance mechanisms in *Escherichia coli*. *EBioMedicine*. 2019;46:184-192.



145. Galani I, Nafplioti K, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Souli M. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):167.
146. Lilić B, Filipić B, Malešević M, Novović K, Vasiljević Z, Kojić M, et al. Fluoroquinolone-resistant *Achromobacter xylosoxidans* clinical isolates from Serbia: high prevalence of the *aac(6′)-Ib-cr* gene among resistant isolates. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(2):153-159.
147. Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, Richter SN, Palù G. Prevalence of *aac(6′)-Ib-cr* plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. *Gut Pathog.* 2011;3(1):12.
148. Girlich D, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Front Microbiol.* 2020;11:256.
149. Livermore DM, Nicolau DP, Hopkins KL, Meunier D. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriales*, Carbapenem Resistant Organisms, Carbapenemase-Producing *Enterobacteriales*, and Carbapenemase-Producing Organisms: Terminology Past its "Sell-By Date" in an Era of New Antibiotics and Regional Carbapenemase Epidemiology. *Clin Infect Dis.* 2020;71(7):1776-1782.
150. Despotovic A, Milosevic B, Milosevic I, Mitrovic N, Cirkovic A, Jovanovic S, et al. Hospital-acquired infections in the adult intensive care unit-Epidemiology, antimicrobial resistance patterns, and risk factors for acquisition and mortality. *Am J Infect Control.* 2020;48(10):1211-1215.
151. Popović R, Tomić Z, Tomas A, Anđelić N, Vicković S, Jovanović G, et al. Five-year surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria at an intensive care unit in Serbia. *J Chemother.* 2020;32(6):294-303.
152. Aris P, Robotjazi S, Nikkhahi F, Amin Marashi SM. Molecular mechanisms and prevalence of colistin resistance of *Klebsiella pneumoniae* in the Middle East region: A review over the last 5 years. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;22:625-630.
153. Hamel M, Chatzipanagiotou S, Hadjadj L, Petinaki E, Papagianni S, Charalampaki N, et al. Inactivation of *mgrB* gene regulator and resistance to colistin is becoming endemic in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece: A nationwide study from 2014 to 2017. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(4):105930.
154. Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016;47 Suppl 1(Suppl 1):31-37.
155. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(1):E23-E30.
156. Jaidane N, Bonnin RA, Mansour W, Girlich D, Creton E, Cotellon G, et al. Genomic Insights into Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian Teaching Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):e01601-17.
157. Lee YL, Lu MC, Shao PL, Lu PL, Chen YH, Cheng SH, et al. Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among clinically important Gram-negative bacteria, with an emphasis on carbapenems and colistin: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2018. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;54(3):318-328.
158. Zafer MM, El-Mahallawy HA, Abdulhak A, Amin MA, Al-Agamy MH, Radwan HH. Emergence of colistin resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and

- Escherichia coli strains isolated from cancer patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):40.
159. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017;64(6):711-718.
  160. D'Onofrio V, Conzemius R, Varda-Brkić D, Bogdan M, Grisold A, Gyssens IC, et al. Epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Croatia. *Infect Genet Evol.* 2020;81:104263.
  161. Dortet L, Broda A, Bernabeu S, Glupczynski Y, Bogaerts P, Bonnin R, et al. Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(1):110-116.
  162. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3359-3367.
  163. Dortet L, Bonnin RA, Le Hello S, Fabre L, Bonnet R, Kostrzewa M, et al. Detection of Colistin Resistance in *Salmonella enterica* Using MALDIxin Test on the Routine MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometer. *Front Microbiol.* 2020;11:1141.
  164. Liao W, Lin J, Jia H, Zhou C, Zhang Y, Lin Y, et al. Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Escherichia coli* Isolates from Wenzhou, China. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3551-3561.
  165. Nang SC, Li J, Velkov T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol.* 2019;45(2):131-161.
  166. Gharaibeh MH, Shatnawi SQ. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. *Vet World.* 2019;12(11):1735-1746.
  167. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087-3095.
  168. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):508-516.
  169. Wang Y, Liu F, Hu Y, Zhang G, Zhu B, Gao GF. Detection of mobile colistin resistance gene mcr-9 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains of human origin in Europe. *J Infect.* 2020;80(5):578-606.
  170. Lippa AM, Goulian M. Perturbation of the oxidizing environment of the periplasm stimulates the PhoQ/PhoP system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2012;194(6):1457-63.
  171. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75-80.
  172. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2909-13.
  173. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):5696-703.
  174. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the

- PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(6):500-7.
175. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1038-1043.
176. da Silva KE, Thi Nguyen TN, Boinett CJ, Baker S, Simionatto S. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. *Int J Med Microbiol*. 2020;310(7):151448.
177. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Polikarpova SV, Karaseva OV, et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the mgrB gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(2):105850.
178. Mirovic V, Tomanovic B, Lepsanovic Z, Jovcic B, Kojic M. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase from the urine of an outpatient baby boy receiving antibiotic prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):6062-3.
179. Miro E, Rossen JWA, Chlebowicz MA, Harmsen D, Brisse S, Passet V, et al. Core/Whole Genome Multilocus Sequence Typing and Core Genome SNP-Based Typing of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates From Spain. *Front Microbiol*. 2020;10:2961.
180. Gona F, Comandatore F, Battaglia S, Piazza A, Trovato A, Lorenzin G, et al. Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster analysis. *Microb Genom*. 2020;(4):e000347.
181. Ludden C, Lötsch F, Alm E, Kumar N, Johansson K, Albiger B, et al. Cross-border spread of bla<sub>NDM-1</sub>- and bla<sub>OXA-48</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae*: a European collaborative analysis of whole genome sequencing and epidemiological data, 2014 to 2019. *Euro Surveill*. 2020;25(20):2000627.
182. Roe CC, Vazquez AJ, Esposito EP, Zarrilli R, Sahl JW. Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance in Isolates From the Newly Emerging *Klebsiella pneumoniae* ST101 Lineage. *Front Microbiol*. 2019;10:542.
183. Can F, Menekse S, Ispir P, Atac N, Albayrak O, Demir T, et al. Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1235-1241.
184. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(3):260-2.
185. David S, Cohen V, Reuter S, Sheppard AE, Giani T, Parkhill J; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group; ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM), Rossolini GM, Feil EJ, Grundmann H, Aanensen DM. Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;17(40):25043-25054.
186. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22.
187. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):559-62.
188. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013;18(31):20549.

- 
189. Wilson AP. Screening for carbapenem-resistant organisms. *J Hosp Infect.* 2016;94(2):116-7.
  190. Nsubuga P, White ME, Thacker SB. Peter Nsubuga, Mark E. White, Stephen B. Thacker, Anderson MA, Blount SB, Broome CV et al. Public Health Surveillance: A Tool for Targeting and Monitoring Interventions. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2<sup>nd</sup> edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2006. Chapter 53. [citirano 28. oktobra. 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11770/>.
  191. Ontario Agency for Health Protection and Promotion, Provincial Infectious Diseases Advisory Committee. *Annex A – Screening, testing and surveillance for antibiotic-resistant organisms (AROs)*. Annexed to: Routine Practices and Additional Precautions in All Health Care Settings. Toronto, ON: Queen’s Printer for Ontario; 2013.

## Spisak skraćenica

- AFLP Polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (engl. *Amplified fragment length polymorphism*)
- AME Aminoglikozid-modifikujući enzimi
- AmpC Ampicilin C
- ATCC Američka kolekcija tipskih kultura (engl. *American Type Culture Collection*)
- BLAST engl. *Basic Local Alignment Search Tool*
- BMD Bujon mikrodilucija
- bp Bazni par
- CC Klonalni kompleks (engl. *Clonal Complex*)
- CI Interval poverenja (engl. *Confidence interval*)
- CPE Karbapenemaza-produkujuće enterobakterije (engl. *Carbapenemase-producing Enterobacterales*)
- CRE Karbapenem-rezistentne enterobakterije (engl. *Carbapenem-resistant Enterobacterales*)
- CTX-M Cefotaksim-M
- Cys Cistein
- DHP Dehidropeptidaza
- DNK Dezoksiribonukleinska kiselina
- EDTA Etilendiamintetrasirćetna kiselina
- ECOFF Epidemiološki *cut-off*
- ERIC-PCR engl. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR
- ESB� Beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*)
- EUCAST Evropsko udruženje za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)
- GES engl. *Guiana extended-spectrum*
- GIM engl. *German imipenemase*
- IMI engl. *Imipenem-resistant*
- IMP engl. *Imipenem resistant*
- Kbp Kilobazni par
- KPC engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
- L-Ara-4N 4-amino-4-deoksi-L-arabinoza
- LPS Lipopolisaharid
- MALDI-TOF MS Matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vreme leta masena spektrometrija (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)
- MBL Metalo-beta-laktamaze
- MDR Multirezistentan (engl. *Multidrug-resistant*)
- MFP Fuzioni membranski protein (engl. *Membrane Fusion Protein*)
- MIK Minimalna inhibitorna koncentracija
- MLST engl. *Multi-locus sequence typing*
- MLVA engl. *Multi-locus VNTR analysis*
- NCBI engl. *National Center for Biotechnology information*
- NDM engl. *New Delhi metallo-  $\beta$ -lactamase*
- NGS Sekvenciranje nove generacije (engl. *Next generation sequencing*)
- NMC engl. *Non-metallo-carbapenemase-A*
- npr. na primer

- OMP Protein spoljašnje membrane (engl. *Outer membrane protein*)
- OXA Oksacilin
- PCR Reakcija lančanog umnožavanja (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
- PDR Panrezistentan (engl. *Plasmid-resistance determinant*)
- pEtN Fosfoetanolamin (engl. *Phosphoethanolamine*)
- PFGE Gel elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (engl. *Pulsed field gel electrophoresis*)
- PVP Penicilin vezujući proteini
- RAPD Nasumično umnožavanje polimorfne DNK (engl. *Randomly amplified polymorphic DNA*)
- REP-PCR engl. *Repetitive intergenic palindromic PCR*
- RFLP Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Restriction fragment length polymorphism*)
- SAD Sjedinjene Američke Države
- sar. Saradnici
- Ser Serin
- SHV engl. *Sulfhydryl reagent variable  $\beta$ -lactamase*
- SLST engl. *Single-locus sequence typing*
- SME engl. *Serratia marcescens enzymes*
- SNP Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism*)
- ST Tip sekvence (engl. *Sequence type*)
- SZO Svetska Zdravstvena Organizacija
- TAE Tris-sirćetna kiselina i EDTA pufer (engl. *Tris-acetate EDTA*)
- TEM engl. *Temoneira  $\beta$ -lactamase*
- UPGMA engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*
- VIM engl. *Verona integron-encoded metallo-  $\beta$ -lactamase*
- VNTR engl. *Variable Numbers of Tandem Repeats*

## **BIOGRAFIJA**

Snežana Brkić je rođena 14.11.1975. u Smederevskoj Palanci, gde je završila osnovnu školu i Palanačku gimnaziju. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2001. godine sa prosečnom ocenom 8,72. Specijalistički ispit iz Mikrobiologije sa parazitologijom na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu položila je 2010. godine sa odličnom ocenom. Doktorske studije, modul Mikrobi i infekcija, upisala je školske 2016/2017. godine.

Dr Snežana Brkić je nakon pripravničkog staža u Domu zdravlja „Voždovac”, Beograd 2003. godine položila stručni ispit. Radila je u Opštoj bolnici „Stefan Visoki” u Smederevskoj Palanci u periodu 2003-2006. godine kao klinički lekar na Odeljenju pedijatrije sa neonatologijom. Od 2006-2010. godine obavljala je specijalistički staž iz Mikrobiologije sa parazitologijom na Institutu za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut” u Beogradu i na Institutu za Mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon položenog specijalističkog ispita od 2010-2013. godine radila je u Mikrobiološkoj laboratoriji Opšte bolnice „Stefan Visoki” u Smederevskoj Palanci. Od 2013. godine do danas radi u Mikrobiološkoj laboratoriji Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku „Konzilijum” u Beogradu.

Objavila je kao autor ili koautor 7 radova štampanih *in extenso*, kao i 7 radova štampanih u izvodima međunarodnih i domaćih stručnih skupova.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Snežana Brkić**

Broj indeksa: 2016/5088

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „Učestalost i molekularna karakterizacija karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija u Beogradu”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 22.02.2021. godine

**Potpis doktoranda**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Snežana Brkić', is written over a horizontal line.



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Snežana Brkić

Broj indeksa: 2016/5088

Studijski program: Mikrobi i infekcija

Naslov rada: „Učestalost i molekularna karakterizacija karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija u Beogradu”

Mentor: prof. dr Ivana Ćirković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 22.02.2021. godine

**Potpis doktoranda**



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Snežana Brkić', is written over a horizontal line.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „Učestalost i molekularna karakterizacija karbapenemaza-produkujućih vanbolničkih izolata enterobakterija u Beogradu”, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila:

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 22.02.2021. godine

**Potpis doktoranda**



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo - nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo - bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.