



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE MOLEKULSKE MEDICINE

**FENOTIPSKO I GENOTIPSKO DOKAZIVANJE
KARBAPENEMAZA KOD MULTIREZISTENTNIH
SOJEVA *ESCHERICHIA COLI* I
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Zora Jelesić

Kandidat:
Asist. dr Anika Trudić

Novi Sad, 2016. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Anika Trudić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Zora Jelesić
Naslov rada: NR	Fenotipsko i genotipsko dokazivanje karbapenemaza kod multirezistentnih sojeva <i>Escherichia coli</i> i <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija

Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 129 stranica / 20 slika / 13 grafikona / 23 tabele / 297 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija – Molekulska medicina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Klebsiella pneumoniae; Escherichia coli; multirezistencija na antibakterijske lekove; rezistencija na beta-laktame; beta-laktamaze; karbapenemi
UDK	615.281.015.8:579.8
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<i>Escherichia coli</i> i <i>Klebsiella pneumoniae</i> su među najznačajnijim uzročnicima infekcija kod ljudi. Problem predstavljaju multirezistentni sojevi koji se javljaju ne samo u bolničkom nego i u vanbolničkom okruženju. Karbapenemi, beta-laktami sa najširim spektrom delovanja, spadaju u lekove poslednje linije odbrane. Rezistencija na karbapeneme među enterobakterijama je u porastu širom sveta. Može nastati usled prisustva karbapenemaza, enzima koji degradiraju karbapeneme, ili usled hiperprodukcije AmpC cefalosporinaza ili beta-laktamaza proširenog spektra uz gubitak porina. Geni koji kodiraju karbapenemaze se nalaze na mobilnim genetičkim elementima koji im omogućavaju brz prenos. Najčešće karbapenemaze su KPC, NDM, VIM, IMP i OXA-48 enzimi. Detekcija sojeva koji produkuju karbapenemaze nije moguća samo na osnovu profila rezistencije izolata, s obzirom da minimalne inhibitorne koncentracije karbapenema mogu biti u referentnom opsegu. Svaki izolat sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme bi trebalo ispitati kako bi se sprečilo njihovo širenje. Detekcija

karbapenemaza može da se zasniva na fenotipskim i genotipskim metodama. Ciljevi istraživanja su bili da se utvrdi postojanje rezistencije na karbapeneme kod multirezistentnih izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* iz kliničkih uzoraka, da se dokaže produkcija karbapenemaza korišćenjem fenotipskih i genotipskih testova, kao i da se analizira osetljivost izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* sa molekularno dokazanim karbapenemazama. Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna studija u periodu 01.11.2013. do 01.11.2014. godine u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu. U istraživanje je bilo uključeno 300 multirezistentnih izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* konsekutivno izolovanih iz kliničkih uzoraka (krv, punktati, sekret iz donjeg respiratornog trakta, urin i sekret rana) hospitalizovanih pacijenata. Identifikacija do nivoa vrste je vršena klasičnim bakteriološkim metodama. Za ispitivanje osetljivosti korišćeni su disk difuziona metoda i gradijent testovi. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija su ispitane automatizovanim Vitek 2 sistemom (BioMérieux, Francuska), a interpretacija izvršena u skladu sa preporukama CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Za fenotipsko testiranje prisustva beta-laktamaza proširenog spektra korišćen je kombinovani disk test. Za fenotipsko testiranje prisustva karbapenemaza kod sojeva rezistentnih na karbapeneme korišćen je kombinovani disk test i test sinergizma sa dva diska. Detekcija gena za beta-laktamaze *bla_{CTX-M}*, gena za karbapenemaze *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* i *bla_{OXA-48-like}* izvršena je metodom lančane reakcije polimeraze. Genotipizacija odabranih izolata *Klebsiella pneumoniae* izvršena pomoću repetitivne lančane reakcije polimeraze korišćenjem DiversiLab sistema (BioMérieux, Francuska). Od 300 multirezistentnih izolata, bilo je 242

(80,7%) *Klebsiella pneumoniae* i 58 (19,3%) *Escherichia coli* izolovanih iz kliničkih uzoraka. Smanjenu osetljivost na bar jedan karbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) pokazalo je 179 (59,7%) izolata. Fenotipski test za dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra bio je pozitivan kod 87/171 (50,9%) izolata. Gen *bla*_{CTX-M} je dokazan kod 111/121 (91,7%) izolata. Fenotipski test za dokazivanje karbapenemaza bio je pozitivan kod 65/179 (36,3%) izolata, kod 63 (96,9%) je ukazivao na prisustvo metalo-beta laktamaza, a kod 2 (3,1%) na prisustvo karbapenemaza iz grupe A. Senzitivnost fenotipskog testa za dokazivanje karbapenemaza klase A i B iznosila je 100,0%, specifičnost 96,6%, a ukupna tačnost 97,6%. Karbapenemaze su nađene kod 79/179 (44,1%) izolata rezistentnih na karbapeneme. Gen *bla*_{NDM} nađen je kod 58 (32,4%) izolata, *bla*_{OXA-48-like} kod 11 (6,1%), a *bla*_{KPC} kod 2 (1,1%) izolata. Geni *bla*_{VIM} i *bla*_{IMP} nisu detektovani. Kod 8 (4,5%) izolata nađena su 2 gena koja kodiraju karbapenemaze, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48-like}. Određivanjem osetljivosti disk difuzionom metodom i automatizovanim Vitek 2 sistemom, izolati koji produkuju karbapenemaze pokazivali su smanjenu osetljivost na sve testirane beta-laktame i gentamicin, odnosno tobramicin. Visok procenat rezistencije izolati su pokazali u odnosu na ciprofloksacin, levofloksacin i trimetoprim/sulfametoksazol. Najefikasniji antibiotski lekovi su bili amikacin, tigeciklin, fosfomicin i kolistin. Poređenjem minimalnih inhibitornih koncentracija izolata koji produkuju i izolata koji ne produkuju karbapenemaze utvrđena je statistički značajna razlika za meropenem, imipenem, ertapenem, amikacin, gentamicin. Genotipizacijom odabranih izolata *Klebsiella pneumoniae* korišćenjem DiversiLab sistema klonalno širenje je dokazano među izolatima koji produkuju NDM i OXA-48-like karbapenemaze u okviru iste zdravstvene institucije, ali i među

	<p>različitim zdravstvenim ustanovama. Među izolatima rezistentnim na karbapeneme <i>Klebsiella pneumoniae</i> se češće izoluje od <i>Escherichia coli</i>. Kod izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost prema bar jednom karbapenemu, karbapenemaze su detektovane u manje od polovine izolata. Kod ostalih izolata dokazane su beta-laktamaze proširenog spektra koje uz gubitak porina mogu uzrokovati rezistenciju na karbapeneme. Kod izolata <i>Klebsiella pneumoniae</i> sa dokazanim genima koji kodiraju karbapenemaze detektovani su pojedinačni <i>bla</i>_{KPC}, <i>bla</i>_{NDM} i <i>bla</i>_{OXA-48-like} geni, kao i kombinacija gena <i>bla</i>_{NDM} i <i>bla</i>_{OXA-48-like}. Kod izolata <i>Escherichia coli</i> nađeni su samo <i>bla</i>_{NDM} geni. Najefikasniji antibiotski lekovi za izolate koji produkuju karbapenemaze su amikacin, tigeciklin, fosfomicin i kolistin. Izolati sa dokazanim karbapenemazama pokazuju rezistenciju na veći broj antibiotika u odnosu na izolate koji ne produkuju karbapenemaze. Dokazano je klonalno širenje izolata <i>Klebsiella pneumoniae</i> koji produkuju karbapenemaze. Testove za fenotipsku detekciju karbapenemaza bi trebalo koristiti i u rutinskim mikrobiološkim laboratorijama u skladu sa EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) preporukama, a konačnu potvrdu treba izvršiti molekularnim metodama u referentnoj laboratoriji.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	17.04.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član: član: član:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Anika Trudić, MD
Mentor: MN	Zora Jelesić, MD, PhD, Full Professor
Title: TI	Phenotypic and genotypic detection of multiresistant carbapenemase producing <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English /Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Medicine Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia

Physical description: PD	8 chapters / 129 pages / 20 figures / 13 graphs / 23 tables/ 297 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Microbiology – Molecular Medicine
Subject, Key words SKW	Klebsiella pneumoniae; Escherichia coli; Drug Resistance, Multiple, Bacterial; beta-Lactam Resistance; beta-Lactamases; Carbapenems
UC	615.281.015.8:579.8
Holding data: HD	University of Novi Sad Library of the Faculty of Medicine Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> are among the most common human pathogens. Multiresistant strains are emerging not only in hospital settings, but also in the community representing a major concern. Carbapenems, beta-lactams with the broadest spectrum of activity are considered to be antibiotics of last resort. Resistance to carbapenems among enterobacteria is spreading worldwide. It is mainly caused by carbapenemases, enzymes capable of degrading carbapenems or by hyperproduction/overexpression of AmpC beta-lactamases or extended spectrum beta-lactamases with porin loss. Carbapenemase-encoding genes are usually located on mobile genetic elements providing their fast transfer. The most common carbapenemases are KPC, NDM, VIM, IMP and OXA-48. The detection of carbapenemase-producer cannot rely only on the resistance profile as their minimal inhibitory concentration values may sometimes lay within the susceptibility range. Therefore, every multidrug-resistant isolates with lower susceptibility to carbapenems should be tested for the presence of carbapenemases in order to prevent further spreading. The detection of carbapenemases is based on phenotypic and genotypic methods. The aims of the study were

to determine the occurrence of carbapenem resistance in multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples, to detect carbapenemase production using both phenotypic and genotypic methods and to analyze the susceptibility of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The study was conducted from 1st November 2013 to 1st November 2014 at the Center for Microbiology in the Institute for Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia. The study included 300 nonrepetitive multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimen (blood, aspirates, lower respiratory tract secretions, urine and wound secretion) of hospitalized patients. Identification of isolated strains was done using conventional bacteriological methods. Antimicrobial susceptibility was tested using the disk diffusion method and MIC test strips. Minimal inhibitory concentrations were determined using Vitek 2 Compact automated system (BioMérieux, France), interpreted according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommendations. Phenotypic testing of extended-spectrum beta-lactamases production was done using combined disk test. Phenotypic testing of carbapenemase production was done by combined disk test and double-disk synergy test. Detection of *bla*_{CTX-M}, gene encoding extended-spectrum beta-lactamases and *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48-like}, genes encoding carbapenemases was done using PCR. Genotyping of selected *Klebsiella pneumoniae* isolates was done by repPCR using DiversiLab system (BioMérieux, France). From the total of 300 multiresistant isolates, 242 (80.7%) were *Klebsiella pneumoniae* and 58 (19.3%) were *Escherichia coli* obtained from clinical samples. Reduced susceptibility to at least one carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) was found in 179 (59.7%) isolates.

Phenotypic test for extended-spectrum beta-lactamases production was positive in 87/171 (50.9%) isolates. A total of 111/121 (91.7%) isolates harbored *bla*_{CTX-M}. Phenotypic test for carbapenemase production was positive in 65/179 (36.3%) isolates, 63 (96.9%) indicating the presence of metallo-beta-lactamases and 2 (3.1%) indicating the presence of class A carbapenemases. Sensitivity of the phenotypic test for carbapenemase production of class A and B was 100.0%, specificity 96.6% and overall accuracy 97.6%. Carbapenemases were detected in 79/179 (44.1%) carbapenem-resistant isolates. Gene *bla*_{NDM} was found in 58 (32.4%) isolates, *bla*_{OXA-48-like} in 11 (6.1%) and *bla*_{KPC} in 2 (1.1%) isolates. Genes *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} were not detected. In 8 (4.5%) isolates 2 genes encoding carbapenemases were found, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48-like}. Using both disk diffusion method and Vitek 2 automated system for antimicrobial susceptibility testing carbapenemase-producing isolates were resistant to all beta-lactams and also to gentamicin and tobramycin respectively. Resistance rates were high for ciprofloxacin, levofloxacin and cotrimoxazole. Good activity maintained for amikacin, tigecycline, fosfomycin and colistin. Comparing minimal inhibitory concentrations of carbapenemase-producing isolates and non-carbapenemase producers, significant difference was found for meropenem, imipenem, ertapenem, amikacin and gentamicin. Genotyping of selected *Klebsiella pneumoniae* isolates using DiversiLab system, revealed the clonal spread of NDM- and OXA-48-like-producers not only within one healthcare-setting, but also between different healthcare centers. Among carbapenem-resistant isolates, *Klebsiella pneumoniae* was found more often than *Escherichia coli*. Carbapenemases were detected in less than 50% of isolates resistant to at least one carbapenem. In other carbapenem-resistant isolates extended-spectrum beta-

	<p>lactamases were confirmed most likely causing carbapenem-resistance with porin deficiency or porin loss. Among carbapenemase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> bla_{KPC}, bla_{NDM} and $bla_{OXA-48-like}$ genes were detected, as well as combination of 2 genes bla_{NDM} and $bla_{OXA-48-like}$. In carbapenemase-producing <i>Escherichia coli</i> only bla_{NDM} was found. The most efficient antimicrobial drugs among tested carbapenemase-producing isolates were amikacin, tigecycline, fosfomycin and colistin. Carbapenemase-producing isolates were resistant to more antimicrobial agents compared to non-carbapenemase producers. Clonal dissemination of carbapenemase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> was confirmed. Phenotypic detection of carbapenemase production should be done in routine microbiology laboratories according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) recommendations. Final confirmation should be done by molecular methods in the reference laboratory.</p>
Accepted on Senate on: AS	17 th April 2014
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member: member: member:

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Zori Jelesić, mom najvećem učitelju, pre svega na ukazanom poverenju, a potom na neizmernoj podršci, savetima i strpljenju koje mi je pružila tokom višegodišnje saradnje, a čija kruna je izrada ove disertacije. Imala sam ogromnu sreću i izuzetnu čast da sarađujem sa osobom koja svojom predanošću, znanjem i radnom etikom vraća veru u prave vrednosti i čini da mi, mlađi saradnici, ne gubimo motiv i želju za stalnim napretkom.

Želim da iskažem svoju zahvalnost prim. mr sc dr Anki Vukelić, mom stručnom mentoru, na profesionalnoj, ali i prijateljskoj podršci, ne samo tokom izrade disertacije, nego i tokom godina zajedničke saradnje. Budući da sam uz nju načinila svoje prve mikrobiološke korake, pa i otkrila rezistenciju enterobakterija na karbapeneme, zajedničko vreme, preneto znanje i brojni saveti će za mene uvek imati posebnu vrednost.

Zahvaljujem se Milanu Đilasu i Vesni Kukučki na ogromnoj pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dela disertacije. Zajedno smo učili i zajedno savladali brojne izazove uz neizostavno pozitivnu atmosferu i dobro raspoloženje.

Veliko hvala svim zaposlenim u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine, na predusretljivosti i pomoći oko izvođenja praktičnog dela rada, naročito Sneži, Neni i Bonini, koje su uvek našle vremena za praktičnu pomoć i korisne savete, od kojih sam puno naučila i koje su učinile rad u laboratoriji izuzetno prijatnim.

Želim da se zahvalim i dragim kolegicama i saradnicima u Centru za mikrobiologiju, imunologiju i virusologiju Instituta za plućne bolesti Vojvodine na pomoći i podršci oko realizacije sprovedenog istraživanja.

Zadovoljstvo je bilo sarađivati sa dipl. ing. Zoranom Potićem kome se posebno zahvaljujem na pomoći oko statističke obrade podataka, ali i na probuđenoj davno zaboravljenoj ljubavi prema brojevima i računu.

Na kraju, najveću zahvalnost, za koju je izuzetno teško naći prave reči, dugujem svojoj porodici, svojim roditeljima koji su uvek podržavali moju strast prema nauci i učili me da rad, predanost i odricanje naposljetku daju vredan rezultat. Najviše dugujem mojim najmilijima, Vladi i Lukijanu, bez čije beskrajne ljubavi i podrške ne bih uspela. Nadam se da ukradeno vreme neće biti i izgubljeno, te da će ovo istraživanje poslužiti za naredna i doprineti unapređenju kako mikrobiologije, tako i naučne misli u Srbiji.

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 POJAM MULTIREZISTENCIJE.....	2
1.2 ENTEROBAKTERIJE – problem nastanka multiple rezistencije	3
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
1.3 KARBAPENEMI – da li ostajemo bez rešenja?	6
1.4 BETA-LAKTAMAZE KOD ENTEROBAKTERIJA	9
1.4.1 Klasifikacija beta-laktamaza	9
1.4.2 AmpC cefalosporinaze	11
1.4.3 Beta-laktamaze proširenog spektra	12
1.4.4 Karbapenemaze	15
1.5 ULOGA PORINA U NASTANKU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA.....	25
1.6 ULOGA EFLUKS PUMPI U NASTANKU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA.....	26
1.7 DETEKCIJA KARBAPENEMAZA	27
1.7.1 Fenotipska detekcija karbapenemaza	27
1.7.2 Genotipska detekcija karbapenemaza	31
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
3 RADNE HIPOTEZE	34
4 MATERIJAL I METODE	35
4.1 IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA <i>ESCHERICHIA COLI</i> I <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	36
4.2 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI DIFUZIONOM METODOM.....	36
4.3 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI DILUCIONOM METODOM	37
4.4 FENOTIPSKO ISPITIVANJE PRODUKCIJE BETA-LAKTAMAZA.....	38
4.4.1 Fenotipski testovi za dokazivanje beta-laktamaza proširenog spektra	38
4.4.2 Fenotipski testovi za dokazivanje karbapenemaza	38

4.5 GENOTIPSKO ISPITIVANJE – dokazivanje gena rezistencije PCR tehnikom.....	39
4.5.1 Detekcija gena rezistencije na beta-laktamaze proširenog spektra.....	39
4.5.2 Detekcija gena rezistencije na karbapeneme	39
4.6. GENOTIPIZACIJA SOJEVA	43
4.7 OBRADA PODATAKA	43
5 REZULTATI.....	45
5.1 OPŠTE KARAKTERISTIKE UZORKA.....	45
5.2 PRIKAZ REZULTATA IZOLATA KOJI SU POKAZALI SMANJENU OSETLJIVOST NA BAR JEDAN KARBAPENEM.....	47
5.2.1 Fenotipsko dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem	48
5.2.2 Fenotipsko dokazivanje karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem	49
5.2.3 Genotipsko dokazivanje produkcije CTX-M beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem	51
5.2.4 Genotipsko dokazivanje karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem	52
5.3 PRIKAZ REZULTATA IZOLATA SA DOKAZANIM KARBAPENEMAZAMA.....	55
5.3.1 Prikaz osetljivosti izolata koji proizvode karbapenemaze.....	59
5.3.2 Prikaz osetljivosti izolata koji proizvode karbapenemaze u odnosu na izolovanu vrstu	61
5.4 VREDNOSTI MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA KARBAPENEMA I NJIHOVA INTERPRETACIJA KORIŠĆENJEM EUCAST I CLSI STANDARDA	70
5.5 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ISPITIVANIH ANTIBAKTERIJSKIH LEKOVA ODREĐENIH VITEK 2 SISTEMOM KOD IZOLATA KOJI PRODUKUJU KARBAPENEMAZE I IZOLATA KOJI NE PRODUKUJU KARBAPENEMAZE	75
5.6 GENOTIPIZACIJA IZOLATA.....	84
6 DISKUSIJA.....	86
7 ZAKLJUČCI	102
8 LITERATURA.....	104

SKRAĆENICE

<i>bla-</i>	geni koji kodiraju beta-laktamaze
CDT-	kombinovani disk test (<i>eng. combined disk test</i>)
CLSI-	Institut za kliničke i laboratorijske standarde (<i>eng. Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CTX-M-	cefotaksimaza-Minhen
DDST-	test sinergizma sa dva diska (<i>eng. double-disk synergy test</i>)
DNK-	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA-	etilendiamintetrasirćetna kiselina
ESBL-	beta-laktamaze proširenog spektra (<i>eng. extended-spectrum beta lactamases</i>)
EUCAST-	Evropski komitet za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (<i>eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
FDA-	Agencija za hranu i lekove (<i>eng. Food and Drug Administration</i>)
IMP-	imipenemaza
KPC-	karbanemenaza <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>eng. Klebsiella pneumoniae carbapenemases</i>)
LAMP-	izotermalna amplifikacija posredovana “petljom” (<i>eng. loop-mediated isothermal amplification</i>)
MALDI-TOF-	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vreme preleta (<i>eng. matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)
MDR-	multirezistencija, multipla rezistencija (<i>eng. multidrug- resistance</i>)
MIK-	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST-	tipizacija višestrukim sekvencama (<i>eng. multilocus sequence typing</i>)
NDM-	Nju Delhi metalo-beta-laktamaza (<i>eng. New Delhi metallo-beta-laktamase</i>)

OMP-	proteini spoljašnje membrane (<i>eng. outer membrane proteins</i>)
OXA-	oksacilinaze
PCR-	lančana reakcija polimeraze (<i>eng. polymerase chain reaction</i>)
qPCR-	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu; kvantitativna lančana reakcija polimeraze (<i>eng. real-time polymerase chain reaction; quantitative polymerase chain reaction</i>)
repPCR-	repetitivna lančana reakcija polimeraze (<i>eng. repetitive element PCR fingerprinting</i>)
PDR-	panrezistencija (<i>eng. pandrug-resistance</i>)
PFGE-	gel elektroforeza u pulsnom polju (<i>eng. pulsed-field electrophoresis</i>)
RNK-	ribonukleinska kiselina
UK NEQAS-	Nacionalni servis za spoljnu kontrolu kvaliteta Ujedinjenog Kraljevstva (<i>eng. United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>)
UV-	ultra-violetni
VIM-	Verona-integronom kodirana metalo-beta-laktamaza (<i>eng. Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>)
XDR-	ekstenzivno rezistentan (<i>eng. extensively drug-resistant</i>)

1 UVOD

Rezistencija bakterija na antibiotike predstavlja problem koji se javio istovremeno sa uvođenjem antibiotika u kliničku praksu, ali na značaju dobija zbog sve većeg broja i raznovrsnosti rezistentnih mikroorganizama. Proučavanjem porekla različitih mehanizama rezistencije došlo se do zaključka da je rezistencija bakterija na antibiotike široko rasprostranjena u prirodi i da se javlja i u sredinama u kojima nema humanog uticaja. Produkcija prirodnih antibiotika predstavlja jedan od kompetitivnih mehanizama kojim su se bakterije borile za nutrijente. Da bi opstale, osetljive vrste su razvile odbrambene mehanizme (1). Većina bakterija poseduje različite mehanizme kojima se postiže rezistencija na neki lek. Jednom stečena, ona može da se prenosi na rezistentno potomstvo (2). Bakterije su kroz evoluciju do savršenstva razvile mehanizme za akumulaciju gena rezistencije na antibiotike. Geni locirani na hromozomu se prenose direktno na potomstvo (klonarno širenje), dok se geni locirani na plazmidima, transpozonima, integronima i bakteriofagima prenose horizontalno između bakterija istih ili različitih vrsta i rodova. Horizontalni transfer gena se odvija prenosom gena rezistencije na konjugabilne plazmide i transpozone, najčešće mehanizmima konjugacije, transpozicije i mesto-specifične rekombinacije. Integroni nastaju kada se pojedinačne genske kasete integrišu mesto-specifičnom rekombinacijom u jedinstvenu genetičku jedinicu, koja osim sistema za rekombinaciju obezbeđuje i promotor za ekspresiju novougrađene DNK. Na ovaj način integroni formiraju operone gena za rezistenciju na antibiotike koji su deo transpozona lociranih na konjugabilnim plazmidima. Kada se geni rezistencije nađu na ovim elementima njihovo dalje širenje je samo pitanje vremena i selektivnog pritiska (3,4). Iako prirodni antibiotici i mehanizmi rezistencije postoje i evoluiraju milionima godina u humanom okruženju evolutivna bitka između antibiotika i gena rezistencije se drastično ubrzava usled velike koncentracije antimikrobnih agenasa. Selektivni pritisak koji nastaje upotrebom antibiotika favorizuje rezistentne klonove i smatra se osnovnim pokretačem nastanka i širenja rezistencije. Prekomernom upotrebom antibiotika ne delujemo samo selektivno na mehanizme rezistencije već i ubrzavamo evoluciju rezistencije. Rezistentne bakterije mogu da se šire ne samo unutar ograničenog područja, nego i

dalje preko geografskih granica. Rasprostranjivanje rezistentnih patogena se može odvijati preko ljudi, životinja, životinjskih produkata ili kontaminacijom životne sredine (1,5).

Antimikrobna rezistencija je prepoznata na globalnom nivou kao jedna od najvećih pretnji za javno zdravlje ljudi (5). Naročito su značajne infekcije izazvane rezistentnim Gram-negativnim bacilima, koje se sve češće beleže širom sveta (6,7). Antimikrobna rezistencija Gram-negativnih bakterija se zasniva na ekspresiji enzima koji inaktivišu antibiotik ili na neenzimskim mehanizmima. Enzimski kao i neenzimski mehanizmi mogu biti urođeno prisutni kod date vrste na hromozomskim genima ili se mogu steći kao posledica dva genetička događaja: 1) mutacije hromozomskih gena koji dovode do: a) povećanja ekspresije urođenih mehanizama rezistencije (antibiotik-inaktivišućih enzima ili efluks pumpe), b) promene u propustljivosti ovojnice gubitkom porina spoljašnje membrane ili c) modifikacije ciljnog mesta i 2) horizontalnog genskog transfera mobilnih genetičkih elemenata na kojima se nalaze geni rezistencije (najčešće beta-laktamaze, aminoglikozid-modifikujući enzimi i neenzimski mehanizmi) (7).

1.1 POJAM MULTIREZISTENCIJE

Nastanak rezistencije bakterija na više antimikrobnih lekova istovremeno postaje sve veći javnozdravstveni problem s obzirom na često sužen izbor efikasnih antibiotika ili čak odsustvo efikasnog leka za lečenje bakterijskih infekcija. Postoje dokazi da se kod Gram-negativnih bakterija, naročito enterobakterija, geni rezistencije i pridruženi mobilni genetički elementi prisutni na plazmidima, često nalaze grupisani zajedno u velike multirezistentne regione (*eng. multiresistance regions*). Veliki broj gena rezistencije u multirezistentnom regionu omogućava bakteriji brzo i istovremeno sticanje kombinacije gena rezistencije. Usled dejstva selektivnog pritiska, nastaju uspešne kombinacije koje se najčešće javljaju. Povezanost određenog gena rezistencije sa drugima može omogućiti njegovu koselekciju primenom antibiotika iz drugih klasa (4).

Multirezistencija ili multipla rezistencija (*eng. multidrug-resistant-MDR*) označava neosetljivost ili smanjenu osetljivost bakterija na najmanje po jedan antimikrobni lek iz tri ili više klasa antibiotika. Ekstenzivno rezistentne (*eng. extensively drug-resistant-XDR*) bakterije su

neosetljive na sve izuzev jedne ili dve klase antimikrobnih lekova. Panrezistencija (*eng. pandrug-resistance-PDR*) se definiše kao neosetljivost na sve antimikrobne lekove iz svih klasa. Bakterije koje su panrezistentne poseduju apsolutnu rezistenciju što znači da ne postoji odobren antimikrobni lek koji poseduje aktivnost prema takvim sojevima. Postoje bakterije koje su urođeno rezistentne na pojedine antimikrobne lekove ili na čitave klase antimikrobnih lekova. Prilikom procene kategorije multiple rezistencije određenih bakterija takvi lekovi se isključuju. Za enterobakterije preporučene klase antimikrobnih lekova za testiranje su sledeće: aminoglikozidi, cefalosporini prve i druge generacije, cefalosporini treće i četvrte generacije, cefamicini, fluorohinoloni, inhibitori sinteze folata, glicilciklini, monobaktami, karbapenemi, penicilini, penicilini sa inhibitorima beta-laktamaza, fenikoli, fosfonična kiselina i polimiksini (8).

1.2 ENTEROBAKTERIJE – problem nastanka multiple rezistencije

Enterobakterije predstavljaju Gram-negativne bacile koji se uglavnom mogu naći kao deo normalne crevne flore, a istovremeno spadaju u najčešće uzročnike velikog broja infekcija kod ljudi. Lako se prenose među ljudima preko ruku, kontaminirane hrane i vode, a imaju sposobnost sticanja genetskog materijala pomoću horizontalnog genskog transfera uglavnom posredstvom plazmida i transpozona. Zbog toga pojava multirezistencije enterobakterija predstavlja značajan problem naročito iz kliničkog aspekta (9,10).

1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je Gram-negativan bacil koji pripada porodici *Enterobacteriaceae* i predstavlja najzastupljeniju fakultativno anaerobnu vrstu u gastrointestinalnom traktu čoveka i nekih životinja. Kao komesal crevnog trakta živi u uzajamno korisnoj zajednici sa domaćinom i kao takva retko uzrokuje oboljenja. Pored komensalnih *Escherichia coli*, postoje sojevi koji su enterovirulentni i uzrokuju različite vrste dijarealnih sindroma. Neki sojevi *Escherichia coli*

uzrokuju ekstraintestinalna oboljenja kod osoba kod kojih su prvobitno asimptomatski kolonizovali crevni trakt. Takvi sojevi *Escherichia coli* su filogenetski i epidemiološki udaljeni u odnosu na komensalne i patogene sojeve. Na osnovu genetskih i kliničkih kriterijuma sojeve *Escherichia coli* možemo da podelimo na komensalne, enterovirulentne i ekstraintestinalne patogene *Escherichia coli* (11). Ekstraintestinalne patogene *Escherichia coli* su značajan uzročnik bolničkih i vanbolničkih infekcija i mogu izazvati oboljenja različitih organa. Najčešće uzrokuju infekcije urinarnog trakta, izazivajući 85-95% nekomplikovanih cistitisa i pijelonefritisa kod žena pre menopauze. *Escherichia coli* je čest uzročnik abdominalnih i pelvičnih infekcija, kao jedini uzročnik ili u sklopu mešanih infekcija. Javlja se kao uzročnik infekcija operativnog polja, neonatalnog meningitisa i septikemije, a može da uzrokuje i pneumoniju (12). Virulentni potencijal ekstraintestinalne *Escherichia coli* zavisi od prisustva specijalizovanih faktora virulencije kao što su fimbrije, adhezini, toksini, siderofore, kapsula, hemolizini i invazini. Navedeni faktori virulencije omogućavaju bakteriji izbegavanje mehanizama odbrane domaćina, kolonizaciju značajnih anatomskih područja i podsticanje inflamatornog odgovora, što sve zajedno doprinosi razvoju bolesti (13). *Escherichia coli* je jedna od najprilagodljivijih bakterijskih vrsta a njena adaptabilnost je rezultat visoke plastičnosti genoma, sticanja ili gubitka gena preko horizontalnog genskog transfera (11).

Uticaj *Escherichia coli* na mortalitet i morbiditet kod ljudi nije bio zabrinjavajuć usled dostupnosti efikasne antibakterijske terapije. Nažalost, situacija se menja poslednjih decenija usled rastuće rezistencije *Escherichia coli* na antimikrobne lekove koja se beleži širom sveta, sa prisutnim razlikama u odnosu na geografsko područje (11,14). Jedan od dominantnih faktora rizika za širenje rezistentnih sojeva *Escherichia coli* i gena rezistencije jeste selektivni pritisak nastao usled prekomerne upotrebe antibakterijskih lekova u humanoj medicini, veterini i poljoprivredi (15). Do 90-tih godina prošlog veka uobičajeno visok nivo rezistencije sojevi *Escherichia coli* su pokazivali u odnosu na peniciline i trimetoprim, a nizak u odnosu na treću generaciju cefalosporina i nitrofurantoin. Od kraja 90-tih godina beleži se rastuća rezistencija na fluorohinolone i produkcija beta-laktamaza proširenog spektra multirezistentnih sojeva koja se javlja ne samo među bolničkim nego i među vanbolničkim izolatima (16). Multirezistentni izolati nisu uobičajeni samo u bolničkom okruženju već se javljaju i kod zdrave populacije (17,18). Pojava sojeva sa produkcijom beta-laktamaza proširenog spektra značajno je smanjila terapijske

mogućnosti. Rezistencija na skoro sve cefalosporine u prvi plan stavlja karbapeneme, lekove poslednje linije odbrane. Novi problem predstavljaju sojevi *Escherichia coli* rezistentni na karbapeneme koji se za sada javljaju uglavnom među bolničkim izolatima (19,20). Kako *Escherichia coli* predstavlja deo normalne flore ljudi i životinja, često se nalazi u čovekovom okruženju, jasno je kakav javnozdravstveni problem bi predstavljala široka rasprostranjenost multirezistentnih sojeva koji produkuju karbapenemaze.

1.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je Gram-negativan bacil koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Spada u oportunističke patogene, a može da se nađe u crevnom traktu, ustima i na koži ljudi, kao i na medicinskim uređajima i u bolničkoj sredini (21). Oportunistički sojevi *Klebsiella pneumoniae* najčešće izazivaju oboljenja kod imunološki kompromitovanih osoba. *Klebsiella pneumoniae* je u prošlosti bila značajan uzročnik teške vanbolničke pneumonije, a danas je čest uzročnik infekcija urotrakta, bilijarnog trakta, osteomijelitisa i septikemije (22). Postoji najmanje 78 kapsularnih serotipova *Klebsiella pneumoniae* od kojih naročito K1 i K2 pokazuju jedinstveni hipermukoidi (hipervirulentni) fenotip usled povećane produkcije kapsularnog polisaharida. Kapsularni polisaharid se smatra najznačajnijim faktorom virulencije. Hipervirulentni sojevi *Klebsiella pneumoniae* su veoma invazivni i mogu da uzrokuju teška oboljenja kod prethodno zdravih osoba kao što su piogeni apscesi jetre, meningitis, nekrotizirajući fascitis, endoftalmitis i teška pneumonija (23). Epidemiologija infekcija izazvanih *Klebsiella pneumoniae* se izmenila u eri primene antimikrobne terapije, te su danas najčešće bolničke infekcije (24). Neposredno pre razvoja bolničkih infekcija dolazi do kolonizacije gastrointestinalnog trakta, ali i urinarnog trakta i respiratornog trakta pacijenta. Takođe, *Klebsiella pneumoniae* može da stvara biofilm na medicinskim sredstvima kao što su endotrahealni tubusi ili kateteri što omogućava nastanak infekcije naročito kod kritično obolelih (25). Bolničke infekcije uzrokovane sojevima *Klebsiella pneumoniae* su često hronične zbog dva glavna razloga: biofilm koji klebsijela stvara štiti bakteriju od imunog sistema domaćina i od antibiotika, a i bolnički izolati često pokazuju

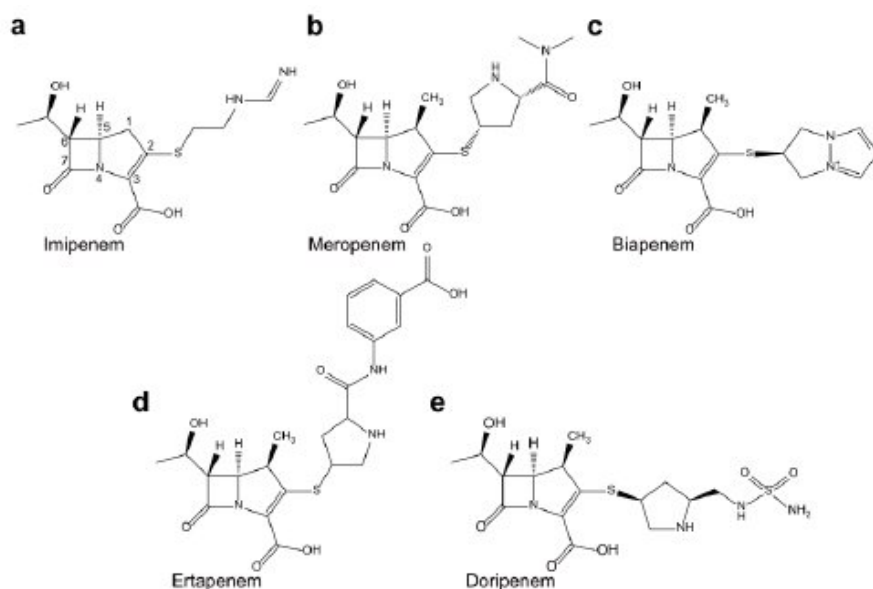
multirezistentni fenotip (26,27). *Klebsiella pneumoniae* je svrstana u takozvanu “ESKAPE” grupu patogena (zajedno sa *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter spp.*) koji zajedno predstavljaju najčešće uzročnike bolničkih infekcija jer “izbegavaju” (eng. *escape*) antibakterijske lekove zbog razvoja rezistencije na antimikrobne agense (28). Sojevi *Klebsiella pneumoniae* često poseduju plazmide različite veličine koji nose gene rezistencije što doprinosi rastućoj rezistenciji na veliki broj antimikrobnih agenasa kao što su penicilini, cefalosporini, karbapenemi, aminoglikozidi i fluorohinoloni (29). Međunarodno širenje *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze predstavlja jedno od najurgentnijih javnozdravstvenih pitanja (30).

U lečenju infekcija izazvanih enterobakterijama koriste se najčešće beta-laktamski antibiotici, fluorohinoloni i aminoglikozidi. Beta-laktamski antibiotici inhibiraju sintezu ćelijskog zida. Najčešće korišćeni predstavnici efikasni protiv enterobakterija su ampicilin, amoksicilin, piperacilin, tikarcilin bez ili sa inhibitorima beta-laktamaza (klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom), cefalosporini proširenog spektra (ceftazidim, cefotaksim, cefepim) i karbapenemi (imipenem, meropenem i ertapenem) (9). Beta-laktamski antibiotici su izuzetno dobri lekovi jer deluju na strukture koje ne postoje u humanim ćelijama. Njihova efikasnost je na žalost sve manja usled globalne pojave i širenja rezistencije naročito poslednjih decenija.

1.3 KARBAPENEMI – da li ostajemo bez rešenja?

Karbapenemi su među beta-laktamskim antibioticima lekovi sa najširim spektrom delovanja, efikasni i protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (31). Imipenem je prvi karbapenem uveden u kliničku praksu 1985. godine kao N-formimidoil derivat tienamicina. Zbog osetljivosti na deaktivaciju bubrežnom dehidropeptidazom imipenemu je bilo neophodno dodati inhibitor cilastatin. Nakon otkrića imipenema došlo je do otkrića drugih, stabilnijih karbapenema sa širim spektrom delovanja (meropenem, biapenem, ertapenem i doripenem) (32). Karbapenemi poseduju penicilinu-sličan petočlani prsten, ali je sumpor na C-1 poziciji u petočlanom prstenu

zamenjen ugljenikvim atomom i uvedena je dvostruka veza između C-2 i C-3 (Slika 1) (33). Različiti karbapenemi se razlikuju dominantno u konfiguraciji bočnih lanaca na C-2 i C-6 poziciji (34). Ovakva struktura omogućava izuzetnu stabilnost u odnosu na većinu beta-laktamaza uključujući AmpC enzime i beta-laktamaze proširenog spektra.



Slika 1. Hemijska struktura karbapenema: a) imipenema; b) meropenema; c) biapenema; d) ertapenema i e) doripenema. Beta-laktamsko jezgro je numerisano (33)

Karbapenemi ulaze u Gram-negativne bakterije kroz porine, proteine spoljašnje membrane. Nakon ulaska u periplazmatski prostor karbapenemi se vezuju za penicilin-vezujuće proteine, enzime koji katalizuju sintezu peptidoglikana, centralne strukture ćelijskog zida bakterija. Za efikasnost karbapenema je ključno što mogu da se vezuju za više različitih penicilin-vezujućih proteina. Posledica njihovog delovanja je slabljenje peptidoglikana i prskanje bakterijske ćelije usled osmotskog pritiska (32). S obzirom na širok spektar delovanja i stabilnost u odnosu na mnoge determinante rezistencije, karbapenemi predstavljaju rezervne antibiotike, antibiotike druge linije, rezervisane za lečenje teških bakterijskih infekcija. Pokazuju znatno manje neželjenih delovanja u odnosu na druge rezervne antibiotike, kao što su polimiksini (31).

Mehanizmi rezistencije na karbapeneme odgovaraju mehanizmima rezistencije na beta-laktamske antibiotike i podrazumevaju:

1. Produkciju beta-laktamaza, dominantno karbapenemaza
2. Smanjenje produkcije ili izmena proteina spoljašnje membrane (OMP). Rezistentni fenotipovi se uglavnom javljaju kada se ovaj mehanizam kombinuje sa drugim mehanizmima rezistencije kao što je produkcija beta-laktamaza
3. Efluks pumpe koje mogu da eksportuju beta-laktame izvan ćelije kroz spoljnu membranu, takođe dovode do snižavanja efektivne koncentracije leka u periplazmi
4. Produkciju penicilin-vezujućih proteina niskog afiniteta koji katalizuju reakciju transpeptidacije, što predstavlja značajan mehanizam rezistencije nekih Gram-pozitivnih bakterija. Izmjena penicilin-vezujućih proteina ima mali značaj u nastanku rezistencije na beta-laktame kod Gram-negativnih bakterija kao što su enterobakterije (32,35).

Karbapenemi su godinama uspešno korišćeni za lečenje teških infekcija izazvanih rezistentnim enterobakterijama. Međutim, prvu deceniju 21. veka karakteriše pojava i brzo širenje rezistencije na karbapeneme usled prisustva karbapenemaza. Mogućnost plazmidskog prenosa karbapenemaza ukazala je na mogućnost horizontalnog prenosa gena rezistencije što je i dovelo do pojave enterobakterija rezistentnih na karbapeneme širom sveta u kratkom vremenskom periodu. Iako karbapenemaze ne predstavljaju jedini mehanizam rezistencije na karbapeneme, njihova pojava i brzo širenje imaju najveći javnozdravstveni značaj. Budući da su sojevi koji proizvode karbapenemaze često rezistentni i na druge grupe antimikrobnih lekova, terapijske mogućnosti takvih infekcija su vrlo ograničene (31,36,37). Pored karbapenemaza, kod enterobakterija rezistencija na karbapeneme može da nastane usled smanjenog preuzimanja leka zbog gubitka ili izmene porina zajedno sa prekomernom ekspresijom AmpC cefalosporinaza ili beta-laktamaza proširenog spektra (10).

1.4 BETA-LAKTAMAZE KOD ENTEROBAKTERIJA

Rezistencija na beta-laktame kod enterobakterija najčešće nastaje enzimskom destrukcijom leka, dejstvom beta-laktamaza. Danas je poznato više od 1300 beta-laktamaza, što ovu porodicu enzima čini jednom od najbrojnijih (38).

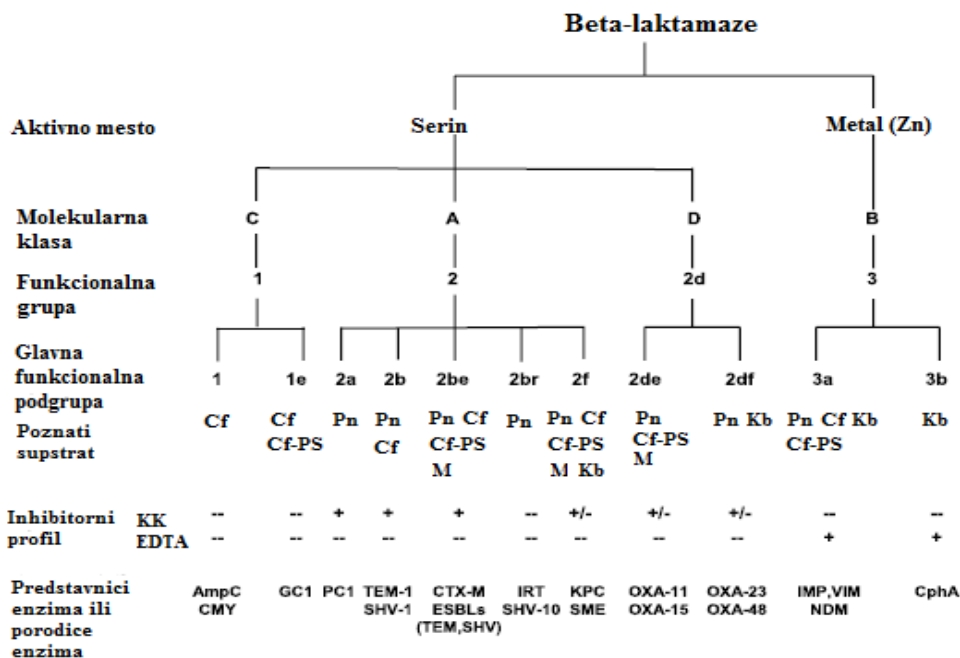
1.4.1 Klasifikacija beta-laktamaza

Klasifikacija beta-laktamaza se zasniva ili na funkcionalnim karakteristikama enzima ili na njihovoj osnovnoj strukturi, odnosno molekularnim karakteristikama (Slika 2) (39,40).

Začeci funkcionalne klasifikacije beta-laktamaza datiraju od 1968. godine kada su Savaji i saradnici razdvojili hromozomalne beta-laktamaze enterobakterija specifične za vrstu, u enzime sa aktivnošću u odnosu na peniciline i cefalosporine (38). Funkcionalna klasifikacija beta-laktamaza koju su sačinili Ričmond i Sajks 1973. godine se zasnivala na: hidroliznom profilu, osetljivosti na inhibiciju p-hlormerkuri-benzoatom i kloksacilinom, kao i na tome da li je produkcija enzima posredovana plazmidski ili hromozomski. Hidrolizni profil se zasnivao na relativnoj aktivnosti u odnosu na cefaloridin i benzilpenicilin, te su definisane „cefalosporinaze“, „penicilinaze“ i enzimi „širokog spektra“ u slučaju hidrolize i jednog i drugog supstrata (41). Karen Buš je 1989. godine napravila reviziju navedene klasifikacije (39) i predstavila funkcionalnu klasifikaciju beta-laktamaza koja je proširena 1995. godine (42). Zasnivala se na biohemijskim karakteristikama enzima, a podelila je beta-laktamaze u četiri velike grupe sa brojnim podgrupama. Dopunom funkcionalne klasifikacije Bušova i Džejkobi 2010. godine beta-laktamaze konačno dele u 3 glavne grupe i 16 podgrupa. Enzimi su raspoređeni na osnovu sposobnosti hidrolize određene klase beta-laktama i na osnovu inaktivacione moći inhibitora beta-laktamaza (klavulanske kiseline, sulbaktama i tazobaktama) (43).

Početak molekularne klasifikacije predstavlja nalaz aminokiselinskih sekvenci četiri beta-laktamaze 1980. godine (38). Ričard Ambler je na osnovu pojedinih, tada poznatih, penicilinaza *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* i *Escherichia coli* definisao molekularnu klasu A. Molekularnu klasu B je definisala beta-laktamaza koja je sadržala cink na

aktivnom mestu izolovana iz *Bacillus cereus* (40). Pomenuta beta-laktamaza je tada predstavljala jedinu identifikovanu metalo-beta-laktamazu, verovatno usled nedostatka selektivnog pritiska, s obzirom da se sa kliničom primenom karbapenema počelo tek krajem 1985. godine (38). Sledeći Amblerovu definiciju stukturane klasifikacije 1981. godine Jaurin i Grundstrom predstavljaju molekularnu klasu C, ukazujući na razlike između AmpC cefalosporinaza i beta-laktamaza klase A i B (44). Molekularnu klasu D predstavili su Huvijen i saradnici serinskom beta-laktamazom kasnije imenovanom u OXA-10, koja se značajno razlikovala od enzima iz prethodne 3 klase (45). Danas je u upotrebi molekularna klasifikacija po Ambleru koja je zasnovana na homologiji aminokiselina i podrazumeva četiri velike klase A, B, C i D, koje koreliraju sa funkcionalnom klasifikacijom bez pojedinosti vezanih za enzimsku aktivnost samog enzima. Klase A, C i D označavaju enzime koji hidrolizuju svoje supstrate formirajući acil-enzime preko aktivnog serinskog mesta, dok klasa B beta-laktamaza predstavlja metaloenzime sa barem jednim jonom cinka, neophodnim za njihovu katalitičku aktivnost (46).



Slika 2. Molekularne i funkcionalne karakteristike glavnih grupa beta-laktamaza (46)

*Skracenicice: Pn-penicilini, Cf-cefalosporini uskog spektra, Cf-PS-cefalosporini proširenog spektra, Kb-karbapenemi, M-monobaktami, KK-klavulanska kiselina, EDTA-etilendiamintetrasirćetna kiselina

1.4.2 AmpC cefalosporinaze

AmpC beta-laktamaze su klinički značajni enzimi kodirani od strane hromozomskih gena kod mnogih enterobakterija. Dovode do rezistencije na većinu penicilina, cefalotin, cefazolin, cefoksitin i inhibitore beta-laktamaza. Dobri inhibitori su kloksacilin, oksacilin, boronična kiselina, dok klasični inhibitori beta-laktamaza pokazuju slabije dejstvo (47,48). Hromozomski AmpC enzimi su inducibilni i u određenim situacijama može doći do njihove hiperprodukcije. Njihova prekomerna produkcija dovodi do rezistencije na cefalosporine proširenog spektra kao što su cefotaksim, ceftazidim i ceftriakson. Terapija beta-laktamima može da podstakne prekomernu produkciju AmpC cefalosporinaza (49).

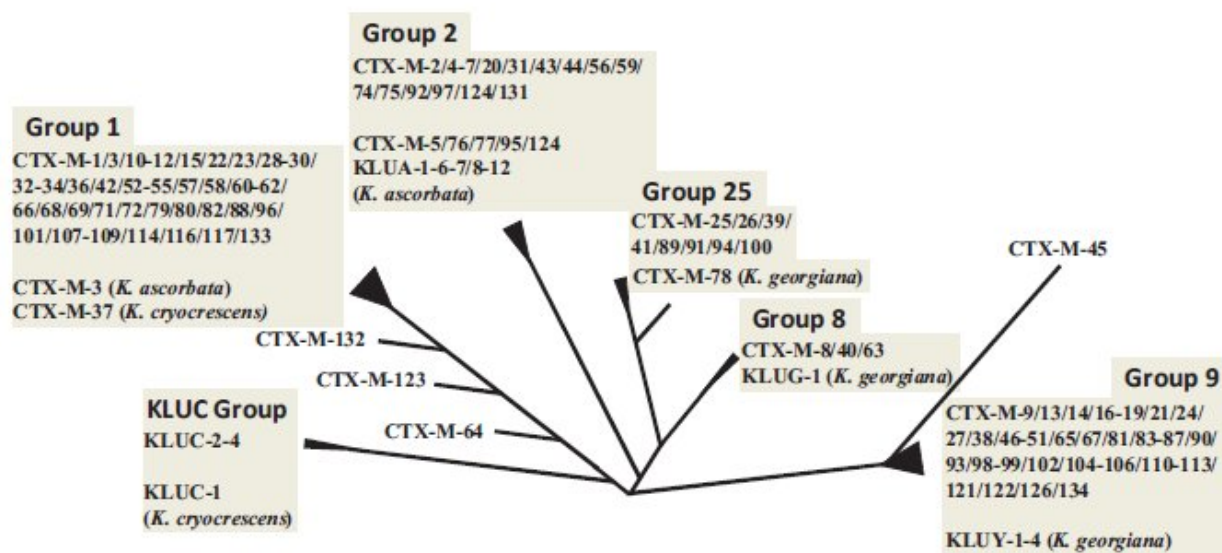
Geni koji kodiraju AmpC beta-laktamaze mogu da se jave na plazmidima. Za plazmidski kodirane AmpC gene se zna od 1989. godine (50). Postoji nekoliko loza mobilnih AmpC gena koje potiču od bakterija kod kojih se urođeno javljaju, a dele se na: *Enterobacter* grupu (MIR, ACT), *Citrobacter freundii* grupu (CMY-2-like, LAT, CFE), *Morganella morganii* grupu (DHA), *Hafnia alvei* grupu (ACC), *Aeromonas* grupu (CMY-1-like, FOX, MOX) i *Acinetobacter baumannii* grupu (ABA). Mogu da se jave kod vrsta koje ne poseduju hromozomske *bla_{ampC}* gene ili su oni slabo eksprimovani kao što su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*. AmpC enzimi smešteni na plazmidima se najčešće konstitutivno ispoljavaju. Plazmidski kodirane AmpC beta-laktamaze su srodne hromozomski kodiranim i dovode do rezistencije na širok spektar beta-laktama. Osetljivost na cefepim, cefpirom i karbapeneme je očuvana. Međutim, kod izolata *Klebsiella pneumoniae* sa gubitkom porina AmpC beta-laktamaze mogu da dovedu do rezistencije na imipenem, meropenem i ertapenem. Takvi sojevi ostaju osetljivi na cefepim, dok su na oksiiimino-cefalosporine rezistentni (51,52). Plazmidi koji nose gene za AmpC beta-laktamaze često nose i gene rezistencije na druge antimikrobne lekove kao što su aminoglikozidi, hloramfenikol, hinoloni, sulfonamidi, tetraciklini i trimetoprim, kao i gene za druge beta-laktamaze. Većina sojeva sa plazmidski kodiranim AmpC enzimima predstavlja bolničke izolate, mada se sve češće javljaju i u vanbolničkim uslovima. Plazmidski kodirane AmpC beta-laktamaze se ređe javljaju nego beta-laktamaze proširenog spektra, iako su rasprostranjene po celom svetu (48).

1.4.3 Beta-laktamaze proširenog spektra

Prva beta-laktamaza proširenog spektra izolovana je 1983. godine u Nemačkoj iz soja klebsijele (53). Prve beta-laktamaze proširenog spektra bile su strukturni mutanti penicilinaza TEM-1, TEM-2 i SHV-1, široko rasprostranjenih među izolatima *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Termin „beta-laktamaze proširenog-širokog spektra“ je primenjen na enzime koji su hidrolizovali oksimino-cefalosporine TEM i SHV tipa, a koji su imali „proširen široki spektar“ u odnosu na „širok spektar“ klasičnih TEM i SHV enzima. Uskoro se reč „širok“ gubi iz termina i 1989. godine se usvaja termin „beta-laktamaze proširenog spektra“ (eng. *extended-spectrum beta lactamase-ESBL*) (54). Beta-laktamaze proširenog spektra su enzimi koji hidrolizuju veliki broj supstrata uključujući većinu penicilina, cefalosporina (sa izuzetkom cefamicina) i monobaktama. Inhibiraju ih inhibitori beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina i tazobaktam (55). U funkcionalnoj klasifikaciji po Bušovoj su se našle u 2b grupi (odnosno u grupi 2be i 2e u kasnijim izmenama) a u molekularnoj klasifikaciji po Ambleru u klasi A (43). Tokom devedesetih beleži se sve veći broj TEM i SHV beta-laktamaza proširenog spektra u različitim delovima sveta, naročito u slučaju bolničkih infekcija, posebno u jedinicama intenzivne nege. Većina epidemija je bila uzrokovana direktnim prenosom određenih klonova sa pacijenta na pacijenta, ali se beleži i plazmidski prenos među različitim sojevima i vrstama. Iako se beleže epidemije izazvane sojevima enterobakterija kao što su *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Enterobacter aerogenes* koje produkuju beta-laktamaze proširenog spektra, daleko najčešće se izoluje *Klebsiella pneumoniae*. Krajem 90-tih počinju da se pojavljuju enzimi CTX-M tipa, koji posle 2000. godine postaju najčešće izolovane beta-laktamaze proširenog spektra (56).

CTX-M beta-laktamaze (CTX-M-cefotaksimaza prvi put izolovana u Minhenu) predstavljaju najčešće izolovane beta-laktamaze proširenog spektra u celom svetu. Prvi CTX-M enzim je nađen 1986. godine u Japanu kod psa korišćenog za farmakokinetička ispitivanja beta-laktama (57). Kod ljudi enzim CTX-M je prvi put izolovan 1989. godine u kliničkom izolatu *Escherichia coli* u Nemačkoj (58). Pomenuti enzimi potiču od *Kluyvera spp.*, gde su hromozomski kodirani (59). Nose naziv prema hidrolitičkom dejstvu na cefotaksim iako njihov spektar podrazumeva cefalosporine proširenog spektra i aztreonam. Kod enterobakterija se

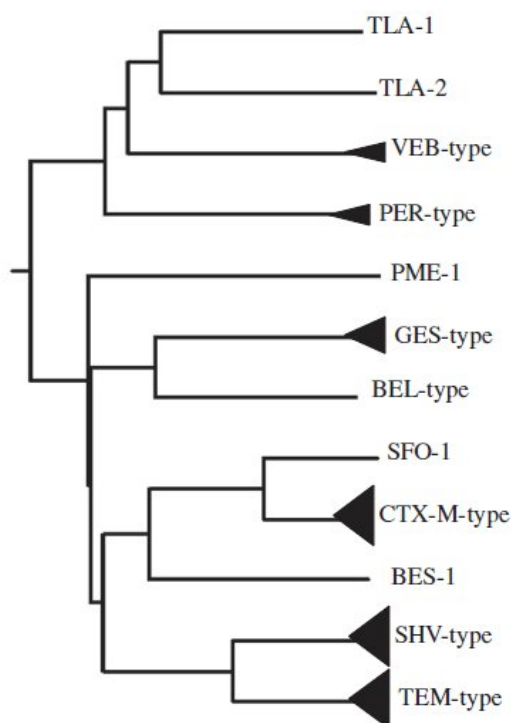
najčešće javljaju kod *Escherichia coli* i *Klebsiella spp.* determinisani genima plazmida. Geni koji kodiraju CTX-M enzime se kod klinički značajnih enterobakterija uglavnom mogu naći na konjugabilnim plazmidima (60) iako kod nekih sojeva *Proteus mirabilis*, ali i povremeno kod drugih vrsta, mogu da se nađu integrisani na hromozomu (61,62). Sveukupno je identifikovano 140 CTX-M enzima i svi pripadaju beta-laktamazama proširenog spektra. Postoji 6 podgrupa: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 i KLUC (63). Najznačajnije beta-laktamaze sa kliničkog aspekta u podgrupi CTX-M-1 su CTX-M-15, CTX-M-3 i CTX-M-1. Navedena podgrupa je široko rasprostranjena po čitavom svetu, naročito po Aziji, Evropi i Severnoj Americi (64,65). Predstavnicu ostalih podgrupa i njihova filogenetska srodnost prikazani su na Slici 3.



Slika 3. Dijagram koji prikazuje srodnost među CTX-M enzima i predstavnike različitih podgrupa CTX-M enzima (63)

Enzim CTX-M-15 sa visokim nivoom hidrolize ceftazidima je trenutno najčešće izolovana beta-laktamaza proširenog spektra u celom svetu među enterobakterijama. Rasprostranjenost *bla*_{CTX-M} gena je naročito zabrinjavajuća budući da se ne javljaju samo među bolničkim sojevima, već i među vanbolničkim izolatima. Njihovo širenje u poslednjih 10-15 godina predstavlja jedan od najbržih i najznačajnijih fenomena u domenu bakterijske rezistencije (66).

Pored „klasičnih“ beta-laktamaza proširenog spektra koje obuhvataju predstavnike enzima TEM, SHV i CTX-M, u beta-laktamaze proširenog spektra ubrajaju se i predstavnici OXA enzima (OXA-11, -14, -15, -16, -28, -31, -35 i -45), neki GES enzimi, PER i VEB (Slika 4). Beta-laktamaze proširenog spektra kao što su BEL, BES, TLA, PME i SFO se ređe javljaju na ograničenim geografskim područjima (66,67).



Slika 4. Modifikovani dendrogram beta-laktamaza proširenog spektra klase A (66)

Rasprostranjenost bolničkih i vanbolničkih izolata enterobakterija koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra, odnosno imaju sposobnost hidrolizovanja skoro svih cefalosporina, beleži se širom sveta od 2000. godine. S obzirom na rastuću rezistenciju na cefalosporine značajno se povećala primena karbapenema, te je postalo neophodno održavanje njihove kliničke efikasnosti kao rezervnih antibiotika neophodnih za prevenciju i lečenje teških bolničkih infekcija (68).

1.4.4 Karbapenemaze

Rezistencija na karbapeneme među enterobakterijama je u porastu širom sveta. Geni koji kodiraju karbapenemaze, enzime koji degradiraju karbapeneme, nalaze se na mobilnim genetičkim elementima koji im omogućavaju brz prenos. Karbapenemaze kod enterobakterija se najčešće javljaju u bolničkim izolatima *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (20,68). U klinički značajne karbapenemaze spadaju serinske beta-laktamaze klase A i D i metalo-beta-laktamaze klase B po Ambleru.

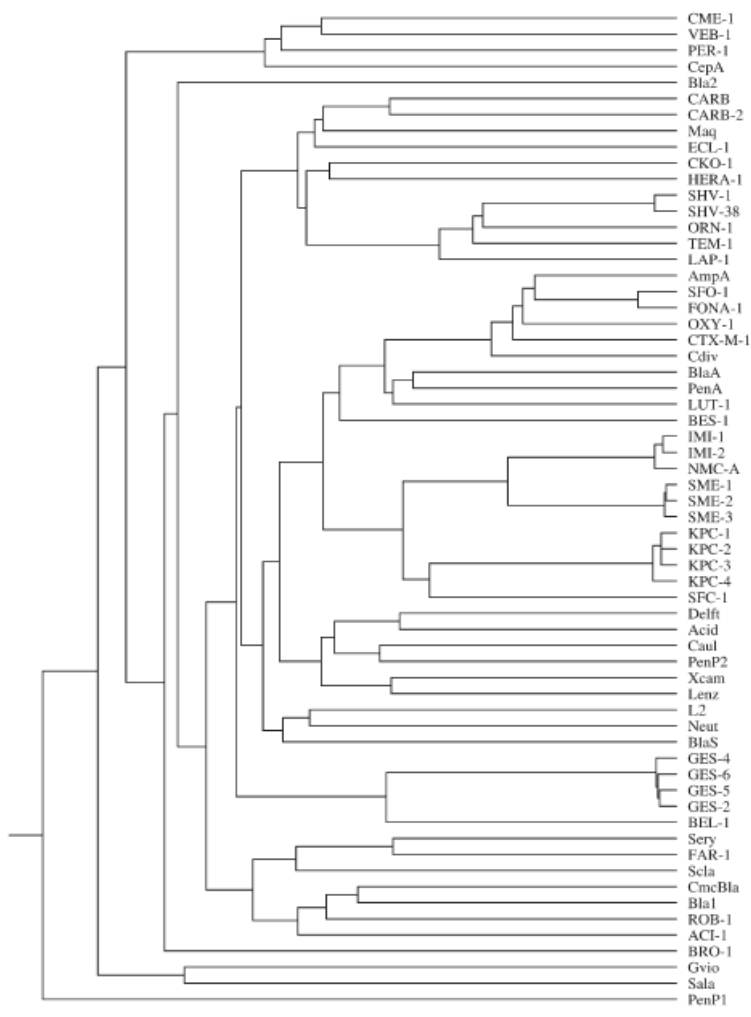
1.4.4.1 Molekularna klasa A karbapenemaza

Klasu A serinskih karbapenemaza čine enzimi gupe 2f po funkcionalnoj klasifikaciji. Svi predstavnici imaju sposobnost hidrolize penicilina, cefalosporina, karbapenema i aztreonama. Inhibiraju ih inhibitori beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina i tazobaktam. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem mogu biti različite, od umereno povišenih do visokih, te su karbapenemaze klase A mogle biti neprepoznate u rutinskom radu (69). Karbapenemaze klase A mogu biti hromozomski kodirane (SME, NmcA, SFC-1, BIC-1, PenA, FPH-1, SHV-38), plazmidski kodirane (KPC, GES, FRI-1) ili i hromozomski i plazmidski kodirane (IMI) (70).

Bakterija koja se nalazi u zemljištu, *Streptomyces cattleya* ima sposobnost produkcije tienamicina, čiji derivat je imipenem (71). Životna sredina predstavlja veliki rezervoar različitih gena rezistencije koji su omogućavali opstanak velikom broju bakterijskih vrsta. Prvi izolati sa karbapenemazama klase A detektovani su i pre nego što su karbapenemi odobreni za kliničku primenu, te se njihova primena ne može smatrati odgovornom za evoluciju enzima klase A (72).

U glavne tipove karbapenemaza klase A spadaju IMI/NmcA, SME i KPC enzimi. Četvrti predstavnik predstavlja enzime GES tipa koji se svrstavaju u klasične beta-laktamaze proširenog spektra, s tim da pojedine varijante pokazuju slabiju ali značajnu aktivnost prema karbapenemima, kao što su GES-2, GES-4 i GES-5 koji se javljaju kod enterobakterija (72,73).

Na dendrogramu (Slika 5) je prikazano zajedničko poreklo enzima IMI/NmcA, SME, KPC i SFC-1 koje se značajno razlikuje od GES enzima.

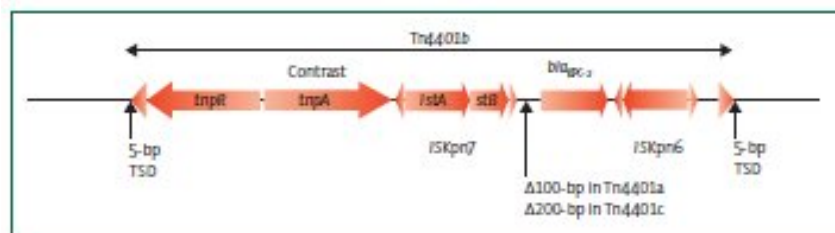


Slika 5. Dendrogram dobijen na osnovu reprezentativnih prekursora klase A beta-laktamaza (72)

Enzimi SME (*eng. Serratia marcescens enzyme*) tipa spadaju u prve karbapenemaze identifikovane kod enterobakterija. Nađene su prvi put 1982. godine u 2 izolata *Serratia marcescens* u Engleskoj (74). Do sada su SME enzimi nađeni isključivo kod izolata *Serratia marcescens*. Postoje 3 varijante enzima (SME-1, -2 i -3) koji su kodirani hromozomskim genima i javljaju se u Velikoj Britaniji i sporadično u SAD (75). Geni bla_{SME} nisu ubikvitarni

među sojevima *Serratia marcescens*, već se javljaju samo u određenoj subpopulaciji navedene vrste. Enzimi IMI/NmcA (eng. *imipenemase/non-metallo-carbapenemase A*) obuhvataju 2 podgrupe, IMI i NmcA. Nađeni su u pojedinačnim kliničkim izolatima *Enterobacter cloacae* u Velikoj Britaniji, Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), Francuskoj i Argentini (76,77). Geni bla_{NmcA} su hromozomski. Gen bla_{IMI-1} i pridruženi *imi-R* gen su hromozomski, dok se geni bla_{IMI-2} i njihovi *imi-R* geni javljaju na plazmidu. Plazmidski *imi-R-imi-2* genski kompleksi su nađeni kod izolata *Enterobacter asburiae* iz okoline u SAD (78) i izolata *Enterobacter cloacae* u Kini (79).

Karbapenemaze KPC (eng. *Klebsiella pneumoniae carbapenemases – KPC*) su trenutno najznačajniji enzimi klase A. Prvi put su identifikovani 1996. godine u Severnoj Karolini u Sjedinjenim Američkim Državama, u izolatu *Klebsiella pneumoniae* (80). Do sada je nađeno 11 varijanti enzima. Zanimljivo je da KPC-1 enzim ne postoji, pošto je utvrđeno da je sekvenca KPC-1 i KPC-2 enzima identična, te je u upotrebi ostala oznaka KPC-2 (81). Nakon otkrića KPC enzima za nekoliko godina izolati *Klebsiella pneumoniae* sa KPC enzimima su se mogli naći po čitavoj teritoriji Sjedinjenih Američkih Država, Južnoj Americi, Izraelu, Kini, Grčkoj i drugim evropskim zemljama (82). U Evropi danas predstavljaju najzastupljenije karbapenemaze (83). Iako su se navedeni enzimi dominantno javljali kod *Klebsiella pneumoniae* nađeni su i kod *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* (82). Osim kod enterobakterija, KPC enzimi nađeni su i kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* (84) i *Pseudomonas putida* (85). Geni bla_{KPC} se uglavnom nalaze na velikim plazmidima koji se razlikuju po veličini i strukturi. Međutim, jedan specifičan klon *Klebsiella pneumoniae*, ST258 sa bla_{KPC} genom se javlja širom sveta (86). Navedeni klon je verovatno i doprineo širenju bla_{KPC} gena. S druge strane, unutar istog geografskog područja mogu da se jave različiti KPC klonovi koji se razlikuju po MLST (eng. *multilocus sequence typing-MLST*-tipizacija višestrukim sekvencama) tipu, sadržaju beta-laktamaza i veličini plazmida (10). Geni bla_{KPC} se nalaze na transpozonu Tn3 tipa, Tn4401, koji poseduje gene za transpozazu (*tnpA*) i resolvazu (*tnpR*) i dve nesrodne insercione sekvence ISKpn6 i ISKpn7 (Slika 6) (87).

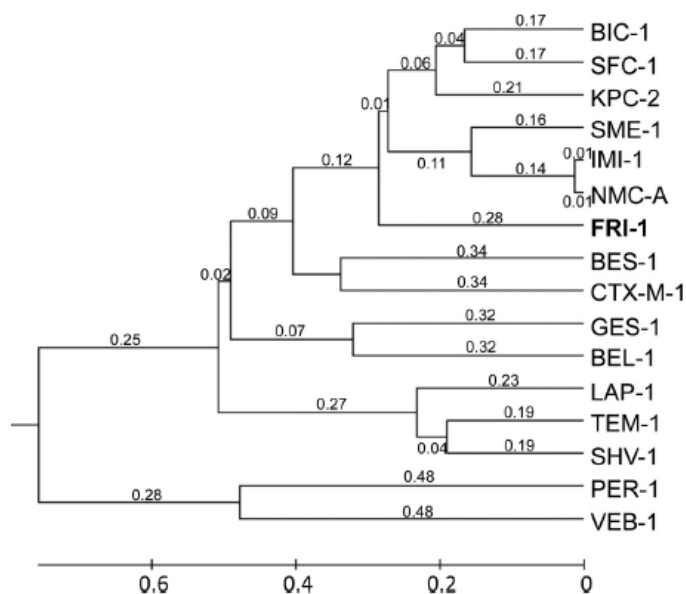


Slika 6. Shematski prikaz strukture transpozona Tn4401 nađenog na prirodnim plazmidima (87)

*Geni i njihovi odgovarajući smerovi transkripcije su označeni horizontalnim strelicama. Tn4401 je ograničen dvema invertovanim repetitivnim sekvencama (veliki trouglovi na krajevima). Mali trouglovi predstavljaju invertovane ponovke dve nesrodne insercione sekvence, ISKpn6 i ISKpn7. Mesto udvojanja (TSD) Tn4401 veličine 5bp je označeno. Tn4401a se razlikuje od Tn4401b u deleciji veličine 100bp uzvodno od gena za beta-laktamaze. Tn4401c se razlikuje od Tn4401b u deleciji veličine 200 bp u istom regionu kao i Tn4401a. Region sa delecijom kod Tn4401 je označen.

Postoje dokazi o mogućnosti *in vivo* transfera plazmida sa bla_{KPC} genima između dve vrste enterobakterija (88). Međutim, plazmidi se ne mogu preneti sa *Klebsiella pneumoniae* na *Pseudomonas aeruginosa*, što horizontalni prenos između navedenih vrsta čini prilično teškim. S obzirom na svojstva transpozicije, Tn4401 se može naći na velikom broju plazmida kod različitih vrsta sa kojih bi prenos bio moguć na *Pseudomonas aeruginosa* ili čak na *Acinetobacter baumannii* (87). Plazmidi koji nose bla_{KPC} gene uglavnom nose i druge determinante rezistencije na aminoglikozide (*rmtB*), fluorohinolone (QnrA i QnrB) i druge beta-laktame (82).

Pored opisane 4 glavne grupe karbapenemaza klase A, značajno je pomenuti enzim FRI-1 (*eng. French imipenemase*) nađen 2015. godine u Francuskoj kod izolata *Enterobacter cloacae* iz urina pacijenta lečenog u Švajcarskoj (Slika 7). Enzim je plazmidski kodiran i pokazuje drugačiji hidrolizni profil u odnosu na KPC enzime (89).



Slika 7. Dendrogram dobijen na osnovu reprezentativnih prekursora klase A beta-laktamaza sa FRI-1 enzimom (89)

1.4.4.2 Molekularna klasa B karbapenemaza

Metalo-beta-laktamaze predstavljaju klasu B po Ambleru i pripadaju funkcionalnoj grupi 3. Razlikuju se po mehanizmu delovanja u odnosu na ostale beta-laktamaze koje poseduju serin na aktivnom mestu. Jon metala na aktivnom mestu dovodi do smanjenja njihove osetljivosti na beta-laktamske inhibitore i omogućava im hidrolizu širokog spektra beta-laktamskih antibiotika, pa pored penicilina i cefalosporina obuhvata i karbapeneme, sa izuzetkom monobaktama. Inhibitori beta-laktamaza poput klavulanske kiseline, tazobaktama ili sulbaktama na njih ne deluju ali ih EDTA i slični helatorni agensi inhibiraju (90).

Na molekularnom nivou metalo-beta-laktamaze predstavljaju različite grupe proteina te je klasifikacija i standardizacija njihove strukture veoma zahtevna. Klasa B je podeljena na 3 potklase na osnovu strukturnih osobina, afiniteta cinkovog jona za dva vezujuća mesta i karakteristika hidrolize. Potklase B1 i B3 su podeljene na osnovu homologije aminokiselina, vezuju dva cinkova atoma za optimalnu hidrolizu, dok su enzimi potklase B2 inhibirani kada se

veže drugi cinkov atom. Subklasa B2 pretežno hidrolizuje karbapeneme, za razliku od B1 i B3 podgrupe koje pokazuju širi spektar (90,91). Predstavnici podgrupa su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Podgrupe klase B metalo-beta-laktamaza sa najčešćim predstavnicima (33,91)

Podgrupa	Metalo-beta-laktamaze	Supstrat
B1	BcII, CcrA, IMP-1, VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-7, BlaB, NDM-1, SPM-1, GIM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1, Bla2, KHM-1	Pencilini, cefalosporini, karbapenemi
B2	CphA, SFH-1, ImiS, AsbM1	Karbapenemi
B3	L1, FEZ-1, BJP-1, AIM-1, THIN-B, GOB-1, CAU-1, CAR-1, SMB-1, POM-1 CRB11	Pencilini, cefalosporini, karbapenemi

Prvi izolat sa dokazanim metalo-beta-laktamazama je bio *Bacillus cereus* 1966. godine (92). Potom slede izolati bakterija spoljašnje sredine i oportunista kao što su *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas spp.* kod kojih su metalo-beta-laktamaze urođene, a kodiraju ih hromozomski geni (93,94).

Najznačajnije porodice stečenih metalo-beta-laktamaza su VIM, IMP i NDM. Enzim KHM-1 je nađen u izolatu *Citrobacter freundii* u Japanu i retko se javlja (95). Enzim GIM-1 (eng. *German imipenemase*) je prvi put nađen u izolatu *Pseudomonas aeruginosa* u Nemačkoj (96). Od tada se javlja među izolatima *Pseudomonas aeruginosa* ali i kod *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* i *Acinetobacter pittii* (97). Zabrinjavajuća je pojava GIM-1 među drugim vrstama enterobakterija kao što su *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Klebsiella oxytoca* u poslednje vreme samo u Nemačkoj (98). SPM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1 i AIM-1 do sada nisu nađeni među enterobakterijama, a mogu se naći kod izolata pseudomonasa ili acinetobaktera (10,33).

Prva stečena metalo-beta-laktamaza, enzim IMP-1, je izolovana 1988. godine u Japanu iz kliničkog izolata *Pseudomonas aeruginosa* rezistentnog na karbapeneme (99). Tri godine kasnije

gen za isti enzim nađen je kod *Serratia marcescens* izolovane iz urina u bolnici u Japanu (100). Danas postoji 48 varijanti IMP enzima koji se mogu naći u izolatima enterobakterija, pseudomonasa i acinetobaktera u celom svetu, a najčešće u Japanu, Tajvanu i Kini (97). Smatra se da je selekcija gena koja kodira IMP nastala usled opsežne primene imipenema u Japanu. Analizom genetičkog okruženja bla_{IMP} gena dokazano je da se oni najčešće prenose integronima klase 1. Geni bla_{IMP} su često udruženi sa jednim ili više gena rezistencije kao što su geni rezistencije na aminoglikozide (*aacA4*, *aacA1* i *aadB*), hloramfenikol (*catB*) i beta-laktamaze klase D (bla_{OXA}). Koegzistencija različitih gena rezistencije na integronu ne podrazumeva uvek koekspresiju svih gena. Upotreba antibiotika može da dovede do promene u ekspresiji određenih gena (101).

VIM-1 (eng. *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*) enzim je prvi put nađen u Italiji 1997. godine (102). Nedugo potom se opisuje VIM-2 u izolatu *Pseudomonas aeruginosa* u Francuskoj (103). Trenutno postoji 41 varijanta VIM enzima koji se uglavnom nalaze kod izolata *Pseudomonas aeruginosa*, ređe i kod enterobakterija. Geni takođe odgovaraju genskim kasetama unutar integrona klase 1 (104). VIM-2 enzim je najčešća metalo-beta-laktamaza u svetu sa endemskim javljanjem u južnoj Evropi, Jugoistočnoj Aziji i sporadičnim epidemijama u Africi i nekim evropskim zemljama (97,104). Grčka predstavlja endemsko područje za enterobakterije koje proizvode VIM-1. Iako se najčešće javlja kod izolata *Klebsiella pneumoniae*, VIM-1 se detektuje i kod *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia spp.* i *Klebsiella oxytoca* (105,106).

NDM (eng. *New Delhi metallo-beta-lactamase*) enzimi predstavljaju klinički izuzetno značajne karbapenemaze. NDM-1 karbapenemaza je prvi put identifikovana u Švedskoj 2008. godine iz izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* kod pacijeta prethodno lečenog u Nju Delhiju u Indiji. Enzim NDM-1 se strukturno značajno razlikuje od drugih metalo-beta laktamaza, najrodniji je VIM-1/VIM-2 karbapenemazama sa sličnošću od 32,4% (107). Do sada je otkriveno 12 varijanti enzima, od kojih je 8 publikovanih, a većina potiče iz Azije. Većina bakterija sa enzimom NDM-1 nosi bla_{NDM-1} gen na konjugabilnim plazmidima, i najčešće se nalazi kod *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, ali i kod *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.* i *Providencia spp.* Gen

bla_{NDM} nije povezan ni sa jednim klonom, vrstom ili plazmidom, a može se naći kod nesrodnih Gram-negativnih vrsta, uglavnom enterobakterija, na različitim tipovima plazmida (108).

Dokazana je jaka veza između $bla_{\text{NDM-1}}$ gena i ble_{MBL} koji kodira bleomicin-protein rezistencije. Utvrđeno je da se geni nalaze unutar istog operona i zajedno eksprimiraju pod kontrolom istog promotera. Postoji mogućnost da su NDM-1 karbapenemaze podlegle selekciji usled prisustva proteina sličnih bleomicinu od strane bakterija iz životne sredine kao što su bakterije *Streptomyces spp.* Sojevi koji proizvode bleomicin rezistentne-proteine su mogli da opstanu usled selekcije molekulima sličnim bleomicinu koji se prirodno proizvode (109). Širenje bla_{NDM} gena ne može da se dovede u vezu sa širenjem određene genetičke strukture. Karakteristično je jedino da je bla_{NDM} gen u vezi sa ostatkom insercione sekvence *ISAbal25* nađene kod *Acinetobacter baumannii*. Aktuelna hipoteza o poreklu bla_{NDM} je da se bla_{NDM} gen prvo integrisao u hromozom *Acinetobacter baumannii* sa nepoznate bakterijske vrste iz životne sredine i da je potom plazmidima prenet na enterobakterije. Kandidati za progenitore bla_{NDM} gena su ili Gram-pozitivne vrste slične *Streptomyces* rodu ili Gram-negativne vrste slične *Stenotrophomonas* rodu (10).

Svi sojevi koji proizvode NDM mogu da eksprimiraju mnoge druge gene rezistencije kao što su geni koji kodiraju AmpC cefalosporinaze, beta-laktamaze proširenog spektra, druge karbapenemaze, rezistenciju na aminoglikozide (16S RNK metilaze), makrolide (esteraze), fluorohinole (Qnr), rifampicin (rifampicin-modifikujuće enzime), sulfametoksazol i hloramfenikol (108,110). Glavni rezervoar enterobakterija koje proizvode NDM je indijski potkontinent (Indija, Pakistan, Šri Lanka) (111). Sojevi koji proizvode NDM su nađeni ne samo kod pacijenata u navedenom geografskom području već i u zemljištu (112). Značajno širenje sojeva sa NDM produkcijom se beleži u Velikoj Britaniji, a javljaju se praktično u celom svetu, u brojim zemljama Azije, Afrike, Australije, Amerike i Evrope (113). Balkan, Bliski Istok i severnoafričke zemlje potencijalno predstavljaju sekundarni rezervoar sojeva koji proizvode NDM metalo-beta-laktamaze, što potvrđuje i činjenica da identifikacija bakterija koje proizvode NDM nije uvek u vezi sa indijskim potkontinentom (97).

1.4.4.3 Molekularna klasa D karbapenemaza

Na prve predstavnike klase D karbapenemaza se odnosio naziv „oksacilinaze“ zbog znatno brže hidrolize izoksazolilpenicilin oksacilina u odnosu na „klasične“ penciline, kao što je benzilpenicilin (114). Oznaka „OXA“ klase D beta-laktamaza se izvodi iz naziva pomenutog supstrata. Postoji više od 350 predstavnika klase D od kojih nekolicina pokazuje hidroliznu aktivnost u odnosu na karbapeneme (81). Karbapenem-hidrolizujući OXA enzimi pokazuju slabiju hidroliznu aktivnost u odnosu na ostale klase karbapenemaza i ne hidrolizuju cefalosporine proširenog spektra. Klasični inhibitori beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina, tazobaktam i sulbaktam na njih najčešće ne deluju inhibitoryno. U *in vitro* uslovima inhibitoryno dejstvo pokazuje natrijum-hlorid (115).

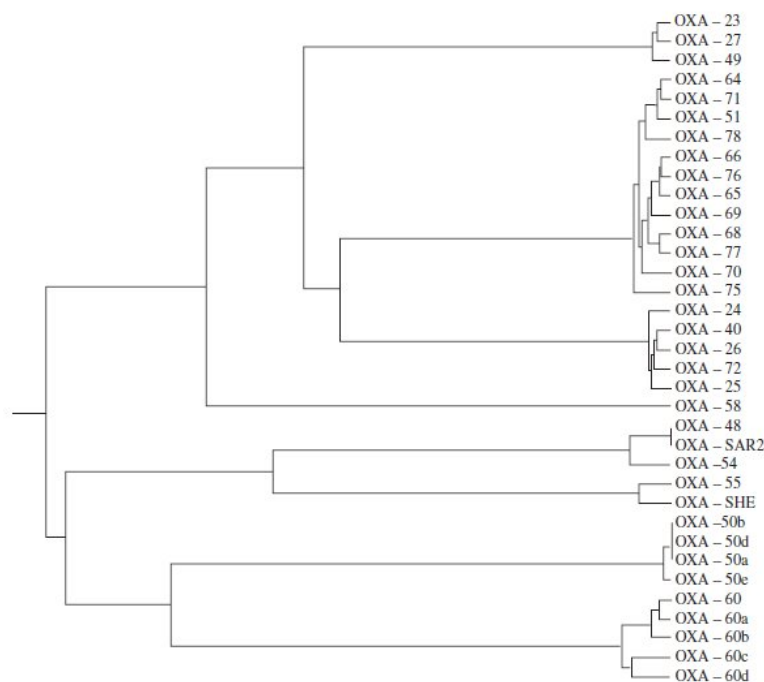
Oksacilinaze se mogu klasifikovati u nekoliko podgrupa. Njihova filogenetska srodnost je prikazana na Slici 8. Enzimi koji pripadaju OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 i OXA-143 podgrupama imaju najveći klinički značaj usled njihove rasprostranjenosti među bakterijskim patogenima. Enzimi OXA-48 se najčešće javljaju među izolatima *Klebsiella pneumoniae* ali i među drugim enterobakterijama, dok se ostale karbapenemaze klase D uglavnom javljaju kod različitih vrsta acinetobaktera, najčešće kod izolata *Acinetobacter baumannii* (116).

Iako progenitori za najčešće gene koji kodiraju karbapenemaze nisu poznati, poreklo karbapenemaza klase D se dovodi u vezu sa rodom *Shewanella* koji se može naći u vodenoj sredini. Gen bla_{OXA-54} koji se javlja kod *Shewanella oneidensis* pokazuje srodnost od preko 92% u odnosu na bla_{OXA-48} . *Shewanella xiamenensis* se smatra progenitorom za $bla_{OXA-181}$, sa identičnom sekvencom nađenom na hromozomu navedene bakterije. Ako se nađu na mobilnim genetičkim elementima, ovi hromozomski geni mogu da dovedu do rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija.

Enzim OXA-48 prvi put je nađen kod izolata *Klebsiella pneumoniae* 2003. godine u Turskoj (117). Od tada se beleže bolničke epidemije u Turskoj, Južnoj Evropi i Africi. Osim kod izolata *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 se javlja i kod drugih enterobakterija kao što je *Escherichia coli* i *Enterobacter cloacae* (82). Plazmid veličine 62 kb je glavni izvor bla_{OXA-48}

gena i uglavnom ne poseduje druge gene rezistencije (118). Gen bla_{OXA-48} je ograničen sa dve insercione sekvence *IS1999* i tako formira funkcionalni kompozitni transpozon.

Postoje varijante enzima OXA-48 sa istim hidroliznim spektrom koje se razlikuju u samo nekoliko aminokiselina i najčešće se označavaju kao OXA-48-like enzimi. Takav je enzim OXA-162 nađen je u Turskoj, a razlikuje se od OXA-48 samo u jednoj aminokiselini. Varijanta OXA-163 nađena je među izolatima u Argentini. Enzim OXA-181 je nađen kod enterobakterija u Indiji ili kod pacijenata koji su u vezi sa indijskim potkontinentom. Gen $bla_{OXA-181}$ se javlja u potpuno drugačijem genetičkom kontekstu u odnosu na bla_{OXA-48} , na plazmidu veličine 7 kb zajedno sa insercionom sekvencom *ISEcp1*. Osim kod *Klebsiella pneumoniae* nađen je i kod *Citrobacter freundii*, *Providencia rettgeri* i *Escherichia coli*. Enzim OXA-204 se razlikuje od OXA-48 u 2 aminokiseline, a nađen je među izolatima *Klebsiella pneumoniae* u Alžiru i Tunisu. OXA-232 enzim je nastao tačkastom mutacijom OXA-181, a razlikuje se od OXA-48 u 5 aminokiselina (117,119). Pored navedenih, u varijante OXA-48 enzima, spadaju i OXA-48b, OXA-54, OXA-199, OXA-242 i OXA-247 (120).



Slika 8. Dendrogram prekursora OXA karbapenemaza (114)

1.5 ULOGA PORINA U NASTANKU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA

Kod Gram-negativnih bakterija se opisuju različiti tipovi porina koji se klasifikuju u odnosu na njihovu aktivnost (nespecifičan ili specifičan kanal), funkcionalnu strukturu (monomernu ili trimernu) i regulaciju i ekspresiju. Klasičnim porinima se smatraju proteini spoljašnje membrane (OMP). Kod predstavnika rodova *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* i *Klebsiella* osetljivost na beta-laktame je tesno povezana sa prisustvom nespecifičnih porina koji pripadaju grupama OmpC i OmpF. Kod rezistentnih izolata može da se uoči: promena u tipu porina koji se ekspresuje, smanjena ekspresija porina ili prisustvo izmenjenog porina. Ovakvi sojevi se javljaju tokom primene antimikrobne terapije kod pacijenta. Kod njih se uočava smanjena osetljivost na cefalosporine i karbapeneme. Sojevi sa izmenjenim porinima često poseduju beta-laktamaze te pokazuju visok stepen rezistencije na beta-laktamske antibiotike (121).

Kod *Klebsiella pneumoniae* se najčešće uočava izmena porina OmpK35 porinom OmpK36. Porin OmpK35 pripada OmpF grupi porina i poseduje veliki kanal, a porin OmpK36 pripada OmpC grupi i poseduje manji kanal. Osetljivost na beta-laktame, kao što su cefotetan, cefepim, cefotaksim i cefpirom kod sojeva koji poseduju OmpK35 porin je 4 do 8 puta veća u odnosu na one koji ekspresuju porin OmpK36 (122). Kontinuirana izloženost subinhibitornim dozama antibiotika dovodi do sve veće redukcije unosa leka. Potpuna nepropustljivost beta-laktama se postiže potpunim gubitkom OmpC porina kod rezistentnih izolata kao krajnja mera u adaptivnom odgovoru. Gubitkom OmpC porina značajno se smanjuje i unos hranljivih materija, ali se omogućava opstanak bakterijskoj ćeliji u uslovima stalne izloženosti antibioticima (121). Rezistencija na ertapenem nastala usled gubitka porina u kombinaciji sa povećanom ekspresijom beta-laktamaza je dokazana kod kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter spp.* bez detektovanih karbapenemaza (46). Povećanom upotrebom antimikrobnih lekova naročito karbapenema, koji su dizajnirani da odolevanju enzimskoj destrukciji, bakterije pronalaze nove načine kako da smanje intracelularno nakupljanje leka. Mutacije kod porina OmpC i Omp36 nađene kod kliničkih izolata nakon primene antimikrobne terapije primeri su

direktne *in vivo* selekcije funkcionalnih mutacija gena koji kodiraju porine kod enterobakterija (121).

1.6 ULOGA EFLUKS PUMPI U NASTANKU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA

Efluks ili energetski zavistan transport antimikrobnih lekova iz bakterijske ćelije opisan je prvi put 1980. godine i predstavlja izuzetno važan mehanizam rezistencije (123). Svi mikroorganizmi u sklopu svojih fizioloških procesa poseduju efluks pumpe koje mogu učestovati u nastanku rezistencije, s tim da im je klinički značaj često mali osim kada su udruženi sa drugim mehanizmima rezistencije (1). Geni koji kodiraju efluks pumpe se normalno nalaze na bakterijskom hromozomu i mogu da dovedu do nastanka multirezistentnog fenotipa bakterije i bez sticanja gena rezistencije. Aktivacija gena za efluks pumpe mutacijom i indukcijom koju uzrokuje u najvećoj meri selektivni pritisak usled primene antibiotika rezultuje u prekomernoj ekspresiji efluks pumpi. Bakterijski efluks sistemi značajni za prenos antibiotika se dele u 5 velikih porodica (123). Među najbolje proučenim su efluks pumpe koje pripadaju grupi RND (*eng. resistance-nodulation-division*) kojoj pripada AcrAB/TolC a mogu se naći kod različitih Gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ali i drugih enterobakterija. Efluks mehanizmi su često udruženi sa modifikacijom propustljivosti spoljašnje membrane usled gubitka glavnih porina što značajno doprinosi efikasnosti RND efluks pumpe (124). Iako postoje navodi da su penicilini, naročito ampicilin i kloksacilin (125) ali i cefalosporini dobri supstrati AcrAB/TolC efluks pumpe u novijim istraživanjima njihova uloga u promeni osetljivosti na beta-laktame kod *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* nije dokazana (126). Selektovanjem sojeva kod kojih se eksprimuje multipli efluks može doći do razvoja rezistencije na različite klase antibiotika, iako sam efluks ne može direktno da dovede do rezistencije na beta-laktame, pa samim tim ni na karbapeneme (127).

1.7 DETEKCIJA KARBAPENEMAZA

Detekcija sojeva koji produkuju karbapenemaze nije moguća samo na osnovu profila rezistencije izolata, s obzirom da minimalne inhibitorne koncentracije karbapenema mogu biti u referentnom opsegu. Sa druge strane, rezistencija na karbapeneme može biti uzrokovana drugim mehanizmima kao što je smanjena propustljivost ovojnice uz prekomernu produkciju AmpC cefalosporinaza ili beta-laktamaza proširenog spektra (128,129). Stoga bi svaki izolat sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme trebalo ispitati na prisustvo karbapenemaza kako bi se sprečilo njihovo širenje. Detekcija karbapenemaza može da se zasniva na fenotipskim i genotipskim metodama.

1.7.1 Fenotipska detekcija karbapenemaza

Među brojnim fenotipskim testovima koji mogu da ukažu na prisustvo karbapenemaza, postoji šest metoda za fenotipsko ispitivanje prisustva karbapenemaza koje većina mikrobioloških laboratorija u svetu postepeno usvaja i koje su evaluirane u nekoliko multicentričnih studija: 1) modifikovani Hodžov test, 2) test sinergizma sa diskovima inhibitora, 3) hromogene i nehromogene podloge za skrining, 4) biohemijski testovi, 5) spektrofotometrija i 6) MALDI-TOF (*eng. matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*-matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija-vreme preleta) (130).

1.7.1.1 Testovi za skrining na prisustvo karbapenemaza

Hromogene i nehromogene podloge

U osnovi podloge postoji hromogen koji predstavlja supstrat za enzim specifičan za vrstu i dolazi do promene boje usled degradacije sa ciljem identifikacije određene vrste enterobakterija. Različite boje kolonija ukazuju na određenu vrstu ili rod bakterija (131). Korišćenje hromogenih podloga za skrining počelo je sa izolatima koji produkuju beta-

laktamaze proširenog spektra, a zatim su razvijene i za enterobakterije neosetljive na karbapeneme. Postoje i nehromogene podloge za detekciju enterobakterija koje proizvode karbapenemaze, pored karbapenema u sebi sadrže i inhibitore AmpC cefalosporinaza sa ciljem eliminacije enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze a rezistentne su na karbapeneme (132). Podloge za skrining na prisustvo karbapenemaza se značajno razlikuju u mogućnosti detekcije različitih karbapenemaza, a najčešće ne mogu da utvrde prisustvo OXA-48 enzima. Takođe, uglavnom ne dolazi do potpune inhibicije rasta enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze a rezistentne su na karbapeneme, što daje veliki broj lažno pozitivnih rezultata. Mogućnost prikazivanja lažno negativnih rezultata predstavlja činjenica da neki geni koji kodiraju karbapenemaze mogu biti slabo ekspresivni ili neekspresivni. Zbog svega navedenog, nakon korišćenja podloga za skrining na prisustvo karbapenemaza neophodno je uraditi i genotipske testove što značajno povećava troškove i vreme analize (133,134).

1.7.1.2 Testovi za detekciju prisustva karbapenemaza

1) Modifikovani Hodžov test

Modifikovani Hodžov test se bazira na inaktivaciji karbapenema od strane izolata koji proizvode karbapenemaze što omogućava izolatu osetljivom na karbapeneme koji služi kao indikator širenje rasta prema disku koji sadrži karbapenem, a duž linije zasejavanja testiranog izolata. Evidentiran je veliki broj lažno pozitivnih rezultata i loša detekcija NDM enzima (135) te modifikovani Hodžov test ne bi trebalo koristiti za konačnu potvrdu produkcije karbapenemaza (130).

2) Test sinergizma sa diskovima inhibitora

Inhibitorno delovanje EDTA na metalo-beta laktamaze dovelo je do nastanka prvih testova u kombinaciji sa imipenemom za dokazivanje karbapenemaza klase B (136). Imipenem je zamenjen meropenemom koji se bolje pokazao i preporučena je njegova primena zajedno sa EDTA u detekciji metalo-beta laktamaza (137). Za detekciju klase A kao inhibitor najbolje se pokazala boronična kiselina i njeni derivati, iako je sam mehanizam inhibicije još uvek

nepoznat (138). Razvijen je test u kom se koriste oba inhibitora (EDTA i boronična kiselina) zajedno sa diskom meropenema od 10 μg te se na jednoj hranljivoj podlozi mogu detektovati karbapenemaze i razlučiti da li pripadaju klasi A ili B. Razlika od $\geq 5\text{mm}$ u zonama inhibicije između diska meropenema i diska meropenema sa inhibitorom se smatra pozitivnim rezultatom, a vrsta inhibitora određuje klasu A ili B karbapenemaza (139). Uz dodatak kloksacilina kao inhibitora AmpC cefalosporinaza i klavulanske kiseline za inhibiciju beta-laktamaza proširenog spektra, bilo je moguće razlikovati karbapenemaze klase A i B od cefalosporinaza AmpC tipa i beta-laktamaza proširenog spektra koje uz gubitak porina mogu dovesti do rezistencije na karbapeneme (140). Za klasu D karbapenemaza, za koju ne postoji specifičan inhibitor, predložen je temocilin, koji uspešno detektuje OXA-48-like enzime ali samo one koji pokazuju značajnu aktivnost u odnosu na karbapeneme (128). Postoje komercijalno dostupni inhibitorni disk-testovi sinergizma koji se mogu naći u preporukama američkog i evropskog standarda. Navedeni testovi su jednostavni, jeftini i prilično efikasni u detekciji karbapenemaza, pa su prilično zastupljeni u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama. Osnovna mana testa je neophodno vreme inkubacije od 18h što značajno produžava izveštavanje. Kao i kod ostalih testova mogući su lažno negativni rezultati kod neekspresivanih ili slabo ekspresivanih gena (130).

3) Biohemijski testovi

Biohemijski testovi se zasnivaju na hidrolizi imipenema što dovodi do promene pH sredine i posledične promene boje indikatora fenol crvenog iz crvene u žutu. Za detekciju karbapenemaza kod enterobakterija razvijen je Carba NP I test od strane Nordmana i kolega. Test koji dalje diferencira klasu A od klase B se zove Carba NP II. Testovi koji su pozitivni prilikom primene Carba NP I testa, a negativni na Carba NP II test ukazuju na prisustvo karbapenemaza klase D (141). Ista grupa autora razvila je biohemijski test za detekciju karbapenemaza kod *Acinetobacter spp.* (142). Biohemijski testovi su komercijalno dostupni, ali postoje i „in house“ varijante. Zbog relativno niske cene, jednostavnosti i brzine dostupnosti rezultata (2-3h) biohemijski testovi se sve češće koriste u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama. Pomoću njih mogu da se razluče izolati koji produkuju karbapenemaze u odnosu na izolate sa prekomernom produkcijom AmpC cefalosporinaza i beta-laktamaza proširenog

spektra sa smanjenom propustljivošću membrane. Nedostatak testova je što ne mogu da odrede tip karbapenemaza, naročito kod izolata koji poseduju više enzima. Nisu efikasni ni kod izolata sa niskom hidroliznom aktivnošću prema karbapenemima (130).

4) Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je našla primenu u detekciji i diferencijaciji karbapenemaza kod Gram-negativnih bacila korišćenjem imipenema kao supstrata. Apsorbanca po minutu za imipenem se poredi sa apsorbancom imipenema i bakterijskog ekstrakta (143). Navedena metoda je pouzdana u detekciji VIM, IMP i SIM karbapenemaza, dok je manje pouzdana u detekciji NDM enzima i karbapenemaza iz klase D (142).

5) MALDI-TOF masena spektrometrija

MALDI-TOF masena spektrometrija je proteomička metoda koja može indirektno da identifikuje gene rezistencije preko eksprimovanih proteina ili enzima (133,144). U razvijenim zemljama nalazi sve veću primenu u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama u identifikaciji bakterijskih vrsta i podvrsta, ali i gena rezistencije. Karbapenemaze se određuju tako što se nakon inkubacije karbapenema sa ekstrahovanim bakterijskim proteinima, beleži odnos naboja i mase jonizovanog karbapenema i njegovih degradacionih produkata i formira spektar karbapenema i njegovih produkata. Na taj način se identifikuje tip i varijanta karbapenemaza sa senzitivnošću i specifičnošću od 100% za većinu Gram-negativnih bacila (145). MALDI-TOF masena spektrometrija u kombinaciji sa PCR (lančana reakcija polimeraze) se smatra naprednom i brzom metodom za identifikaciju gena rezistencije koja će doprineti boljoj kliničkoj primeni antibiotika (146). Najveći nedostatak je cena aparata, te većina laboratorija nije u mogućnosti da ga priušti (133). Uprkos brojnim prednostima apart ne može da detektuje nepoznate gene rezistencije (130).

1.7.2 Genotipska detekcija karbapenemaza

Među genotipskim metodama značajno mesto ima PCR tehnologija. Pored simpleks PCR u upotrebi je i multipleks PCR u kojem se koriste setovi multiplih prajmera za istovremenu detekciju nekoliko gena što zahteva korišćenje visoko specifičnih prajmera koji se neće uzajamno vezati. Uslovi reakcije moraju biti odgovarajući za sve prajmere, a veličina produkta se mora razlikovati zbog bolje uočljivosti i identifikacije (147). Klasičan PCR sa gel elektroforezom u sve većoj meri zamenjuje PCR u realnom vremenu (qPCR) pomoću kojeg je moguće simultano detektovati i kvantifikovati gene korišćenjem fluorescentnih proba ili boja. Rezultati se na ekranu prikazuju grafički kao intenzitet fluorescencije u odnosu na temperature topljenja što se koristi u analizi krive topljenja. Geni poseduju jedinstvene krive topljenja koje se koriste za njihovu identifikaciju u realnom vremenu bez potrebe za elektroforezom (148). Postoje brojni “*in house*” testovi i komercijalno dostupni kitovi za detekciju gena koji kodiraju karbapenemaze (130).

U upotrebi su i mikroarej testovi za identifikaciju vrste, karbapenemaza, beta-laktamaza uskog i proširenog spektra u jednoj reakciji (149). Razvijaju se i mikroarej testovi za određivanja karbapenemaza direktno iz krvi (150).

Za određivanje karbapenemaza direktno iz uzorka razvijaju se eseji koji se baziraju na izotermalnoj amplifikaciji posredovanoj “petljom” (LAMP). Esej je jeftin, jednostavan, rezultati su dostupni za sat vremena i pokazuje veću senzitivnost za DNK u kliničkim uzorcima u odnosu na PCR (151).

U najsavremenije metode koje se koriste i za određivanje karbapenemaza spada sekvenciranje sledeće generacije (*eng. next generation sequencing*) pomoću koje se kroz sekvenciranje celog bakterijskog genoma dobijaju informacije o tipu karbapenemaza, genetskom okruženju i mobilnim genetičkim elementima (integroni, transpozoni i plazmidi) u samo jednoj reakciji. Navedena tehnologija obezbeđuje informacije o identifikaciji vrste, tipu soja i podatke o celokupnom rezistomu i virulomu izolata, odnosno sveobuhvatan molekularni pregled ispitivanog izolata (152).

Većina mikrobioloških laboratorija se oslanja na fenotipske testove za detekciju karbapenemaza. Savremene metode koje zahtevaju skupu opremu i obučeni kadar kao što su MALDI-TOF masena spektrometrija, mikroareji, LAMP i qPCR služe za dalje ispitivanje izolata koji produkuju karbapenemaze u referentnim laboratorijama. Sekvenciranje celog genoma može da se koristi u složenim epidemiološkim i molekularnim istraživanjima.

Rezistencija na karbapeneme je uočena među kliničkim izolatima enterobakterija i u našoj zemlji. Međutim, ne postoje publikovani podaci o mehanizmima rezistencije na karbapeneme u zdravstvenim ustanovama ni na regionalnom ni na državnom nivou. Ne postoje nacionalni podaci o vrsti karbapenemaza prisutnih u kliničkim izolatima enterobakterija rezistentnih na karbapeneme. U literaturi se mogu naći samo prikazi slučajeva uglavnom pacijenata prethodno lečenih u Srbiji sa pojedinačnim izolatima kod kojih je dokazana produkcija karbapenemaza (153–155).

Detekciju karbapenemaza nije moguće izvršiti na osnovu standardnih mikrobioloških tehnika koje se koriste u rutinskom radu. U Srbiji je mikrobiološkim laboratorijama na raspolaganju ograničen broj fenotipskih testova za skrining i detekciju karbapenemaza. Od genotipskih metoda PCR tehnologija za detekciju karbapenemaza je postala dostupna u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za registrovanje i praćenje rezistencije bakterijskih sojeva na antimikrobna sredstva tokom izrade ove disertacije. Stoga je neophodno ispitati multirezistentne izolate naročito sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na prisustvo karbapenemaza i razjasniti mehanizam rezistencije na karbapeneme među kliničkim izolatima najznačajnijih enterobakterija sa aspekta rezistencije, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Time bi se došlo do boljeg shvatanja epidemiologije rezistencije na karbapeneme u Srbiji u odnosu na susedne zemlje, kao i u odnosu na druge regione u Evropi i svetu. Analizom rezistencije multirezistentih izolata sa dokazanom produkcijom karbapenemaza sa našeg podneblja došlo bi se do saznanja koja bi doprinela uspostavljanju efikasnijeg terapijskog režima kod pacijenata sa infekcijama izazvanim takvim bakterijskim sojevima.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi postojanje rezistencije na karbapeneme kod multirezistentnih *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* izolovanih iz klinički značajnih uzoraka
2. Dokazati produkciju karbapenemaza korišćenjem fenotipskih testova kod multirezistentnih *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* izolovanih iz klinički značajnih uzoraka
3. Molekularnim metodama ispitati izolate sa fenotipski dokazanim karbapenemazama kod multirezistentnih sojeva *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*
4. Analizirati rezistenciju na ispitivane antibiotike kod izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* sa molekularno dokazanim karbapenemazama

3 RADNE HIPOTEZE

Na osnovu definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Rezistencija na karbapeneme značajno češće je prisutna kod izolata *Klebsiella pneumoniae* u odnosu na *Escherichia coli* izolovanih iz klinički značajnih uzoraka
2. Fenotipskim testovima utvrđuje se prisustvo karbapenemaza kod 90% izolata rezistentnih na bar jedan karbapenem
3. Među fenotipski dokazanim karbapenemazama geni rezistencije koji pripadaju KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaze), VIM (Verona-integronom kodirana metalo-beta-laktamaza), NDM (Nju Delhi metalo-beta-laktamaza) ili OXA-48-like (oksacilinaze 48) tipu se nalaze u više od 90% izolata
4. Izolati sa dokazanim karbapenemazama pokazuju rezistenciju na veći broj antibiotika u odnosu na izolate koji ne proizvode karbapenemaze

4 MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno u periodu 01.11.2013. do 01.11.2014. godine u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu.

Istraživanje je planirano kao prospektivna studija.

U istraživanje je uključeno 300 multirezistentnih primoizolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* konsektivno izolovanih iz klinički značajnih uzoraka hospitalizovanih pacijenata. Klinički značajni uzorci podrazumevaju krv, punkt, sekret iz donjeg respiratornog trakta, urin i sekret rana.

Sojevi korišćeni u istraživanju obuhvataju:

1. izolate koji potiču iz kliničkog materijala poslatog na bakteriološki pregled u Centar za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine i Centar za mikrobiologiju, imunologiju i virusologiju, Instituta za plućne bolesti Vojvodine, jedine dve laboratorije u koje pristiže klinički materijal hospitalizovanih pacijenata sa teritorije grada Novog Sada iz Kliničkog centra Vojvodine, Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine, Instituta za plućne bolesti Vojvodine, Instituta za kardiovaskularne bolesti Vojvodine i Instituta za onkologiju Vojvodine
2. sojeve poslate na konačnu identifikaciju i proveru osetljivosti na antibiotike u Nacionalnu referentnu laboratoriju za registrovanje i praćenje rezistencije bakterijskih sojeva na antimikrobna sredstva koja priprada Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Sojevi su slati iz mikrobioloških laboratorija Kliničkog centra Srbije iz Beograda, Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ iz Beograda, Kliničko-bolničkog centra „Dragiša Mišović-Dedinje“ iz Beograda, Zavoda za javno zdravlje Čačak, Zavoda za javno zdravlje Kikinda, Kliničkog centra Kragujevac, Zavoda za javno zdravlje Kraljevo, Instituta za javno zdravlje Niš, Zavoda za javno zdravlje Sombor i Zavoda za javno zdravlje Subotica.

Ukoliko su od istog pacijenta dobijena dva ista izolata *Escherichia coli* ili *Klebsiella pneumoniae*, a iz različitih materijala, samo jedan izolat je uključen u istraživanje.

4.1 IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA *ESCHERICHIA COLI* I *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Svaki klinički značajan uzorak je bio zasejan na krvni agar i Mek Konki agar i inkubiran 18-24 časa na 37°C. Nakon evidentiranja bakterijskog porasta, identifikacija do nivoa vrste je vršena klasičnim bakteriološkim metodama (morfološkim, kulturelnim i fiziološko-biohemijskim) (88) i automatizovanim Vitek 2 Compact sistemom (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francuska).

4.2 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI DIFUZIONOM METODOM

Ispitivanje osetljivosti svih 300 izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* vršeno je Kirbi Bauer tehnikom, disk difuzionom metodom. Za izradu antibiograma bakterijski inokulum je pripremljen od čiste kulture ne starije od 24 časa kao suspenzija gustine od 0,5 Mc Farland standarda. Inokulacija suspenzije je vršena sterilnim brisom, koji je potom zasejan pod pravim uglom u četiri različita pravca po površini Miler-Hinton agara (HiMedia, India). Nakon inokulacije na površinu podloge su stavljeni diskovi antibiotika (Bio-Rad, Francuska), a zatim su ploče inkubirane 16-18 časova na 35-37°C.

Disk difuzionom metodom antibiograma je utvrđena osetljivost na: ampicilin (10 µg), amoksicilin sa klavulanskom kiselinom (20/10 µg), piperacilin/tazobaktam (10/100 µg), cefazolin (30 µg), cefuroksim (30 µg), ceftriakson (30 µg), cefepim (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg), ciprofloksacin (5µg), trimetoprim/sulfametoksazol (25µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg).

Ispitivanje osetljivosti izolata na antibiotike i interpretacija rezultata je izvedena prema važećim američkim preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*eng. Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*) iz 2013. godine (156).

Minimalne inhibitorne koncentracije imipenema, meropenema i ertapenema izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost na bar jedan karbapenem određene su i gradijent testom (MIC Test Strip, Liofilchem, Italija), a interpretacija je izvršena i na osnovu američkih preporuka Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (156) i na osnovu evropskih preporuka Evropskog komiteta za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST*) iz 2015. godine (157).

4.3 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI DILUCIONOM METODOM

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija multirezistentnih izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze kao i nasumično odabranih izolata koji ne proizvode karbapenemaze su ispitane automatizovanim sistemom (Vitek 2 Compact, BioMerieux, Francuska) korišćenjem kartica AST-GN71 i AST-N240 koje obuhvataju sledeće antibiotike: ampicilin, piperacilin, piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, ceftriakson, cefepim, aztreonam, imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloksacin, levofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol, gentamicin, amikacin, tobramicin, tigeciklin, kolistin. Minimalne inhibitorne koncentracije za fosfomicin određivane su pomoću gradijent testova (AB Biodisk, Solna, Švedska).

Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija vršena je na osnovu američkih preporuka Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (156). Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za tigeciklin vršena je na osnovu preporuka Agencije za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration-FDA*) za *Enterobacteriaceae* (osetljiv ≤ 2 mg/L, umereno osetljiv 4 mg/L; rezistentan ≥ 8 mg/L) (158).

Multirezistentnim sojevima su se smatrali oni sojevi koji ispoljavaju rezistenciju na tri ili više grupe antibiotika (8).

4.4 FENOTIPSKO ISPITIVANJE PRODUKCIJE BETA-LAKTAMAZA

4.4.1 Fenotipski testovi za dokazivanje beta-laktamaza proširenog spektra

Za fenotipsko testiranje prisustva beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem korišćen je kombinovani disk test (*eng. combined disk test-CDT*) koji podrazumeva disk cefotaksima, disk cefotaksima sa klavulanskom kiselinom, disk ceftazidima i disk ceftazidima sa klavulanskom kiselinom (Bio-Rad, Francuska). Na prethodno zasejan Miler-Hinton agar suspenzijom ispitivanog soja od 0,5 Mc Farland standarda postavljeni su navedeni diskovi. Nakon inkubacije na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 16-20 časova izmerena je zona inhibicije oko diskova. Ukoliko je zona inhibicije bila veća od 5 mm oko diskova koji sadrže klavulansku kiselinu kao inhibitor u odnosu na diskove cefotaksima i ceftazidima test se smatrao pozitivnim na prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra (159).

4.4.2 Fenotipski testovi za dokazivanje karbapenemaza

Za fenotipsko testiranje prisustva karbapenemaza kod sojeva rezitentnih na karbapeneme korišćen je kombinovani disk test (*eng. combined disk tests-CDT*) za dokazivanje metalo-beta-laktamaza koji podrazumeva disk meropenema bez i sa dodatkom EDTA (Bio-Rad, Francuska). Na prethodno zasejan Miler-Hinton agar suspenzijom ispitivanog soja od 0,5 Mc Farland standarda postavljeni su diskovi meropenema sa i bez dodatka EDTA. Nakon inkubacije na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 16-20 časova izmerena je zona inhibicije oko oba diska. Ukoliko je zona inhibicije oko diska meropenema sa EDTA za najmanje 5mm bila veća od zone inhibicije oko diska meropenema, smatralo se da ispitivani soj produkuje metalo-beta laktamaze (160,161).

Korišćen je i test sinergizma sa dva diska (*eng. double-disk synergy test-DDST*) koji podrazumeva upotrebu diskova meropenema ($10\mu\text{g}$), kloksacilina, boronične kiseline i EDTA (Bio-Rad, Francuska). Diskovi kloksacilina, boronične kiseline i EDTA su postavljeni na prethodno zasejan Miler-Hinton agar suspenzijom ispitivanog soja od 0,5 Mc Farland standarda na najmanje 20 mm razmaka u odnosu na disk meropenema. Nakon inkubacije na $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ u

trajanju od 16-20 časova uvećanje zone inhibicije ili pojava zone u vidu ključaonice između diska meropenema i diska koja sadrži neki od navedenih inhibitora se smatralo pozitivnim rezultatom (129).

4.5 GENOTIPSKO ISPITIVANJE – dokazivanje gena rezistencije PCR tehnikom

4.5.1 Detekcija gena rezistencije na beta-laktamaze proširenog spektra

Ispitano je prisustvo gena *bla*_{CTX-M} u cilju detekcije rezistencije na beta-laktamaze proširenog spektra kod izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR).

4.5.2 Detekcija gena rezistencije na karbapeneme

Prisustvo gena rezistencije na karbapeneme (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48-like}) kod izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* rezistentnih na karbapeneme ispitivano je metodom lančane reakcije polimeraze (117,162–164).

U istraživanju su kao pozitivne kontrole korišćeni sojevi predefinisanih karakteristika iz eksterne kontrole Nacionalnog servisa za spoljnu kontrolu kvaliteta Ujedinjenog Kraljevstva (eng. *United Kingdom National External Quality Assessment Service - UK NEQAS*). Korišćeni su izolati: 1943 *Klebsiella pneumoniae* za gen *bla*_{OXA-48-like}, 1944 *Klebsiella pneumoniae* za gen *bla*_{KPC}, 1945 *Klebsiella pneumoniae* za gen *bla*_{VIM}, 1947 *Klebsiella pneumoniae* za gen *bla*_{IMP} i 1948 *Klebsiella pneumoniae* za gen *bla*_{NDM} iz eksterne kontrole pod brojem 3432A UK NEQAS u sklopu Evropskog nadzora nad enterobakterijama koje proizvode karbapenemaze u Evropi (eng. *European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Europe – EuSCAPE, Proficiency Test & Distribution 3432*).

Kao negativna kontrola korišćena je *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 koja proizvodi beta-laktamaze SHV-18.

4.5.2.1 Ekstrakcija DNK

Za izolaciju ukupne bakterijske DNK ispitivanih sojeva *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* korišćen je metod termičke ekstrakcije. Za ekstrakciju DNK korišćene su sterilne mikroeprove od 2 ml sa 1,5 ml tečne kulture. Tečne kulture ispitivanog izolata su dobijene inokulacijom subkulture ne starije od 24h u triptikaza soja bujon, nakon čega su inkubirane 24h na 35-37°C. Svaka tečna kultura je centrifugirana brzinom od 13000 rpm (Centrifuga 5415C, Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 5 minuta. Nakon toga je odbačen supernatant a u pelet je dodata 200 µl sterilna voda koja ne sadrži DNAzu/RNAzu (Gibco, Invitrogen).

Suspenzija se nakon kratkog mešanja vorteksom zagrevala na 100°C u trajanju od 5 minuta i potom hladila na 4°C u trajanju od 5 do 10 minuta. Nakon hlađenja, suspenzija je centrifugirana brzinom od 13000 rpm u trajanju od 5 minuta i 150 µl dobijenog supernatanta sa izolovanom DNK je preneto u novu sterilnu mikroeprovu. Ekstrahovana DNK ispitivanih izolata je dalje korišćena za istraživanje. Uzorci izolovane DNK su čuvani do 7 dana na temperaturi od 4°C ili do mesec dana na temperaturi od -20°C.

Za detekciju gena *bla*_{CTX-M} korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za gene koji kodiraju ispitivane beta-laktamaze proširenog spektra

Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina produkta (bp)	Referenca
<i>bla</i> _{CTX-M} Fw	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATG GC	592	(165)
<i>bla</i> _{CTX-M} Rw	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGC GG		

Za detekciju gena *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48-like} korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za gene koji kodiraju ispitivane karbapenemaze

Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina produkta (bp)	Referenca
<i>blaKPC</i> Fw	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	(162)
<i>blaKPC</i> Rw	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
<i>blaVIM</i> Fw	GATGGTGTTTGGTTCGCATA	390	(163)
<i>blaVIM</i> Rw	CGAATGCGCAGCACCAG		
<i>blaNDM</i> Fw	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	476	(164)
<i>blaNDM</i> Rw	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
<i>blaIMP</i> Fw	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	188	(163)
<i>blaIMP</i> Rw	CCAAACCACTACGTTATCT		
<i>blaOXA-48-like</i> Fw	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744	(117)
<i>blaOXA-48-like</i> Rw	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		

4.5.2.2 PCR protokoli

PCR reakcije gena koji kodira ispitivane beta-laktamaze proširenog spektra izvedena je kao jedna simpleks reakcija korišćenjem Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Gen *bla_{CTX-M}* je testiran pod sledećim uslovima: 1 ciklus inicijalne denaturacije je izveden na temperaturi od 94 °C u trajanju od 5 minuta, potom je sledilo 30 ciklusa na temperaturi od 94 °C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera je izvedeno na temperaturi od 55°C u trajanju od 30 sekundi i faza elongacije na 72°C u trajanju od 60 sekundi.

PCR reakcije 5 gena koji kodiraju ispitivane karbapenemaze su izvedene kao dve multipleks reakcije i jedna simpleks reakcija korišćenjem Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Za prvu multipleks reakciju korišćeni su prajmeri za *bla*_{NDM} i *bla*_{KPC} gene. Uslovi pod kojima se amplifikacija odvijala su bili sledeći: 1 ciklus inicijalne denaturacije je izveden na temperaturi od 95°C u trajanju od 5 minuta, potom je sledilo 30 ciklusa na temperaturi od 95°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera je izvedeno na temperaturi od 60°C u trajanju od 30 sekundi i faza elongacije na 72°C u trajanju od 60 sekundi, sa 1 ciklusom na 72°C u trajanju od 3 minuta.

Za drugu multipleks reakciju korišćeni su prajmeri za *bla*_{OXA-48-like} i *bla*_{VIM} gene. Uslovi pod kojima se amplifikacija odvijala su bili sledeći: 1 ciklus inicijalne denaturacije je izveden na temperaturi od 95°C u trajanju od 5 minuta, potom je sledilo 30 ciklusa na temperaturi od 95°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera je izvedeno na temperaturi od 58°C u trajanju od 30 sekundi i faza elongacije na 72°C u trajanju od 60 sekundi, sa 1 ciklusom na 72°C u trajanju od 3 minuta.

Gen *bla*_{IMP} je odvojeno testiran pod sledećim uslovima: 1 ciklus inicijalne denaturacije je izveden na temperaturi od 95°C u trajanju od 5 minuta, potom je sledilo 30 ciklusa na temperaturi od 95°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera je izvedeno na temperaturi od 58°C u trajanju od 30 sekundi i faza elongacije na 72°C u trajanju od 60 sekundi, sa 1 ciklusom na 72°C u trajanju od 3 minuta.

4.5.2.3 Detekcija PCR produkata

Amplifikovani produkti su analizirani primenom gel elektroforeze u 2% agaroznom gelu (MBG, Fischer Scientific, SAD) i bojeni etidijum-bromidom i komercijanom bojom (GelPilot Loading Dye, Qiagen, Holandija). Veličina produkta je određivana u odnosu na leder (*eng. ladder*) veličine od 100 baznih parova (TrackIt, Invitrogen, SAD). Vizualizacija je izvršena pod UV lampom prosvetljavanjem gelova što je zabeleženo digitalnom kamerom u mračnoj komori (Biometra, Nemačka) uz korišćenje BioDocAnalyze softvera.

4.6. GENOTIPIZACIJA SOJEVA

Genotipizacija odabranih multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* izvršena je pomoću DiversiLab polu-automatizovanog sistema (BioMérieux, Francuska) koji se bazira na repetitivnom PCR. Ekstrakcija DNK je urađena uz pomoć komercijalnog kita UltraClean microbial DNA (BioMérieux, Francuska), a izolovana DNK je spektrofotometrijski kvantifikovana na Qubit 2.0 fluorometru (Life Technologies, Vivogen, SAD) i rastvorena u vodi za PCR (Gibco, Invitrogen, SAD) do koncentracija od 25 do 50 ng/ml.

Razređena DNK je amplifikovana uz pomoć DiversiLab *Klebsiella* kita (BioMérieux, Francuska), AmpliTaq DNK polimeraze (Applied Biosystems, SAD) i pufera 10x PCR Buffer I (Applied Biosystems, SAD) po uputstvu proizvođača. Amplikoni su analizirani na apartu Agilent 2100 Bioanalyzer sistemu (Agilent Technologies, SAD) sa mikročipovima u kojima se fragmenti DNK razdvajaju prema veličini, što se prikazuje u vidu hromatograma sa vrhovima za svaki amplikon. Sama analiza je izvršena u DiversiLab web softveru koji prikazuje hromatograme kao slike virtualnih gelova i izračunava procenete sličnosti prema modifikovanoj Pearson/Kullback-Leibler metodi. Za interpretaciju rezultata genotipizacije generisani su dendrogrami, skaterplotovi i slike virtualnih gelova.

4.7 OBRADA PODATAKA

Nakon sprovedenog istraživanja, prikupljeni podaci su kodirani i uneti u elektronsku bazu podataka kreiranu u programu Microsoft Office Excel 2007. Rezultati istraživanja su prikazani tekstualno, tabelarno, grafički i fotografijama.

Za statističku obradu podataka korišćen je statistički program (*eng. Statistical Package for the Social Sciences-SPSS for Windows*, SPSS Inc., Sjedinjene Američke Države, ver. 20). Od osnovnih deskriptivnih statističkih parametara korišćene su standardne statističke metode za kvalitativnu i kvantitativnu procenu dobijenih rezultata: apsolutni brojevi, relativni brojevi, aritmetička sredina (\bar{X}), standardna devijacija (SD), opseg vrednosti. Za procenu statističke

značajnosti razlika dobijenih rezultata korišćeni su: Studentov T test, ANOVA, Mann Whitney U test, hi-kvadrat test. Za sve testove su navedeni nivoi statističke značajnosti (p vrednosti). Rezultati su smatrani statistički značajno različitim kada je $p < 0,05$.

Izvršen je proračun senzitivnosti, specifičnosti i ukupne tačnosti za fenotipski test za određivanje karbapenemaza, kao i za svaki pojedinačni karbapenem (meropenem, imipenem, ertapenem) u odnosu na prisustvo karbapenemaza.

Za procenu slaganja nalaza dve dijagnostičke metode korišćen je Kappa test i McNemar test asimetrije. Slaganje se kvantifikuje vrednošću Kappa testa (K) na osnovu statističke metode koju je kreirao COHEN (166). Vrednost K je 1 kada je slaganje perfektno između nalaza dobijenih dvema metodama. Vrednost K je 0 kada je slaganje sasvim slučajno, a K je negativno kada ne postoji slaganje (167). Interpretacija vrednosti K prikazana je u Tabeli 4.

Tabela 4. Način interpretacije vrednosti K

Vrednost Kappa testa (K)	Stepen slaganja
< 0,20	slabo
0,21 – 0,40	delimično
0,41 – 0,60	osrednje
0,61 – 0,80	dobro
0,81 – 1,00	veoma dobro

5 REZULTATI

5.1 OPŠTE KARAKTERISTIKE UZORKA

Od ukupno prikupljenih 300 multirezistentnih izolata iz različitih kliničkih uzoraka hospitalizovanih pacijenata identifikovano je 242 (80,7%) izolata *Klebsiella pneumoniae* i 58 (19,3%) izolata *Escherichia coli*.

U Tabeli 5 je prikazana zastupljenost multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* u odnosu na zdravstvene ustanove koje su učestvovala u istraživanju.

Tabela 5. Zastupljenost multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* u odnosu na zdravstvene ustanove

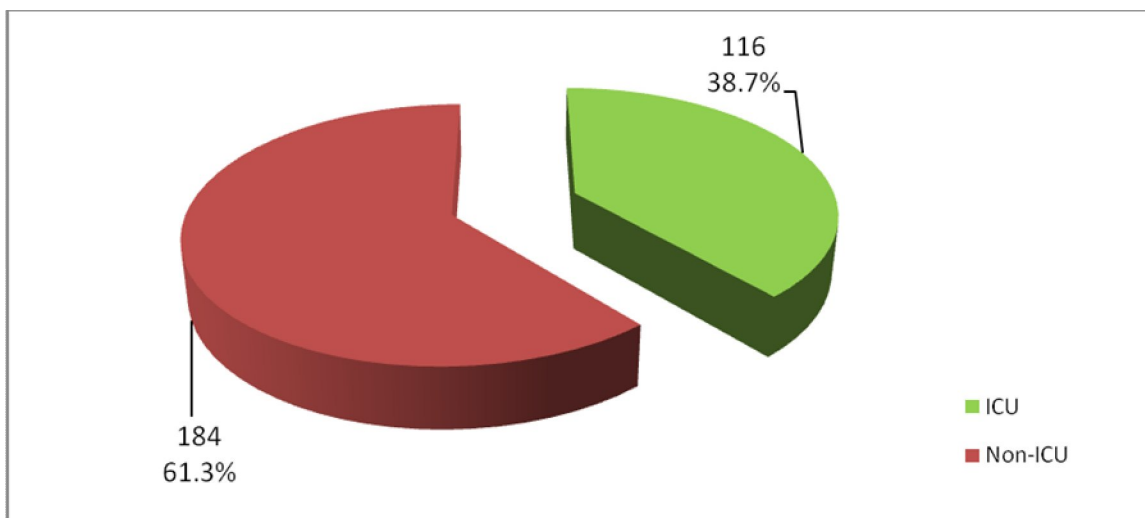
Mesto	Naziv zdravstvene ustanove	N	%
Beograd	Klinički centar Srbije	17	5,7
Beograd	Kliničko-bolnički centar „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“	15	5,0
Beograd	Kliničko-bolnički centar Zvezdara	8	2,7
Čačak	Opšta bolnica Čačak	12	4,0
Kikinda	Opšta bolnica Kikinda	9	3,0
Kragujevac	Klinički centar Kragujevac	8	2,7
Kraljevo	Zdravstveni centar „Studnica“	14	4,7
Niš	Klinički centar Niš	26	8,7
Novi Sad	Klinički centar Vojvodine	95	31,7
Novi Sad	Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine	43	14,3
Sombor	Opšta bolnica "Dr Radivoj Simonović"	1	0,3
Sremska Kamenica	Institut za kardiovaskularne bolesti Vojvodine	5	1,7
Sremska Kamenica	Institut za onkologiju Vojvodine	7	2,3
Sremska Kamenica	Institut za plućne bolesti Vojvodine	38	12,7
Subotica	Opšta bolnica Subotica	2	0,7
<i>Ukupno</i>		<i>300</i>	<i>100,0</i>

Hospitalizovane pacijente je činilo 178 (59,3%) muškaraca i 122 (40,7%) žene. Prosečna starost pacijenata iznosila je 52 (SD=26; opseg: <1-91). Klinički uzorci uključeni u istraživanje bili su urin, krv, sekret iz donjeg respiratornog trakta, sekret rana i puktati. Multirezistentni izolati *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* najčešće su izolavani iz urina (34,7%) i krvi (33,7%), potom iz sekreta koji potiču iz donjeg respiratornog trakta (16,0%), iz sekreta rana (14,3%) i punktata (1,3%). Zastupljenost kliničkih uzoraka iz kojih su izolovani multirezistentni izolati *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Zastupljenost kliničkih uzoraka iz kojih su izolovani multirezistentni izolati *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*

Klinički uzorak	N	%
Urin	104	34,7
Krv	101	33,7
Sekret iz donjeg respiratornog trakta	48	16,0
Sekret rana	43	14,3
Punktati	4	1,3
<i>Ukupno</i>	<i>300</i>	<i>100</i>

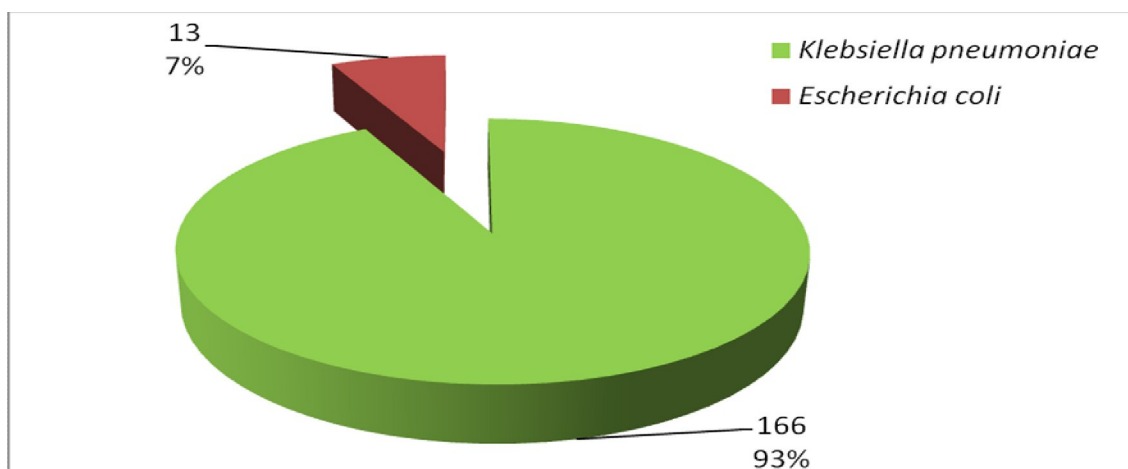
U trenutku uzorkovanja pacijenti su bili hospitalizovani na kliničkim odeljenjima (non-icu) ili u jedinicima intenzivne nege (icu). Na Grafikonu 1 je prikazana zastupljenost uzoraka prema odeljenjima na kojima su pacijenti bili smešteni u trenutku uzorkovanja.



Grafikon 1. Zastupljenost uzoraka prema odeljenjima u trenutku uzorkovanja

5.2 PRIKAZ REZULTATA IZOLATA KOJI SU POKAZALI SMANJENU OSETLJIVOST NA BAR JEDAN KARBAPENEM

Smanjenu osetljivost na bar jedan testirani karbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) pokazalo je ukupno 179 (59,7%) izolata. Grafički prikaz smanjene osetljivosti izolata prema bar jednom karbapenemu u odnosu na vrstu prikazan je na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Smanjena osetljivost izolata prema bar jednom testiranom karbapenemu u odnosu na vrstu

Statistički je češća smanjena osetljivost izolata *Klebsiella pneumoniae* na bar jedan karbapenem u odnosu na smanjenu osetljivost izolata *Escherichia coli* ($\chi^2 = 59,663$; $p < 0,001$).

5.2.1 Fenotipsko dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

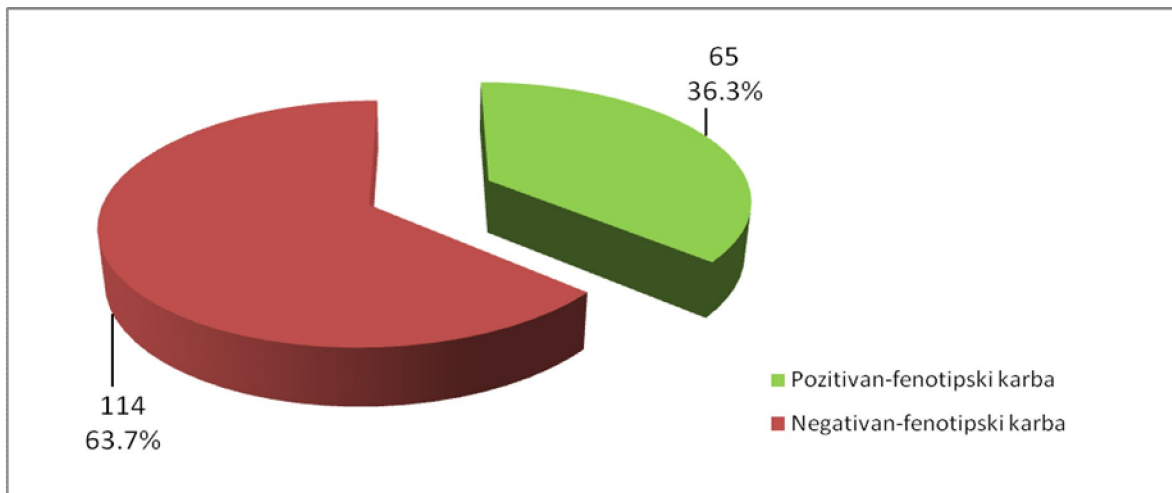
Fenotipski test za dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra je kod 171 testiranog izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem bio pozitivan kod 87 (50,9%) izolata, a negativan kod 84 (49,1%). Primer pozitivnog testa za dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Primer pozitivnog kombinovanog disk testa za dokazivanje produkcije beta-laktamaza

5.2.2 Fenotipsko dokazivanje karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

Od 179 izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost prema bar jednom karbapenemu, fenotipski test za dokazivanje karbapenemaza bio je pozitivan kod 65 (36,3%) izolata što je prikazano na Grafikonu 3.

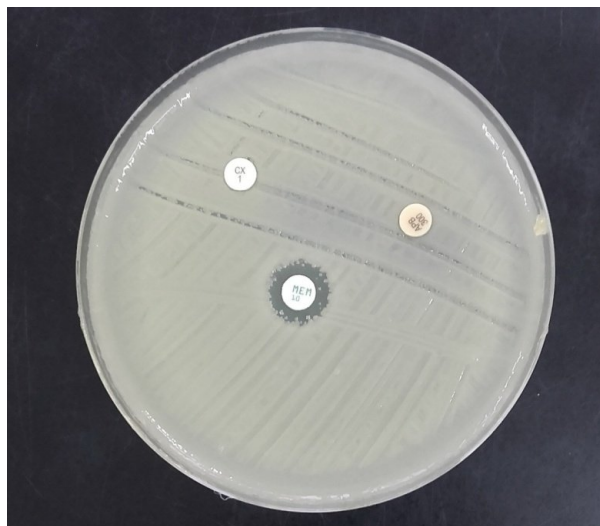


Grafikon 3. Rezultat fenotipskog testa za utvrđivanje prisustva karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

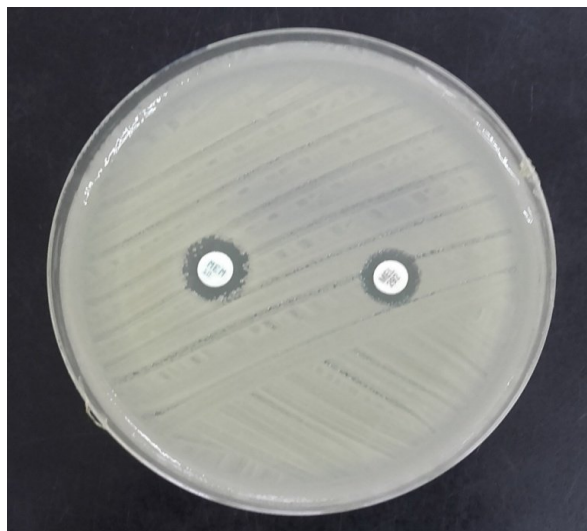
Kod odabranih 56 izolata osetljivih na karbapeneme fenotipski test za utvrđivanje prisustva karbapenemaza je bio negativan. Primer negativnog fenotipskog testa prikazan je na Slici 10. Utvrđena je statistički značajna razlika među izolatima sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem i izolata osetljivih na karbapeneme u odnosu na rezultat fenotipskog testa ($\chi^2 = 28,921$; $p < 0,001$).

Od 65 pozitivnih fenotipskih testova za utvrđivanje prisustva karbapenemaza 63 (96,9%) su ukazivala na prisustvo metalo-beta laktamaza (zona inhibicije oko EDTA), a 2 (3,1%) su ukazivala na prisustvo karbapenemaza iz grupe A (zona inhibicije oko boronične kiseline) što je prikazano na Slikama 11 i 12.

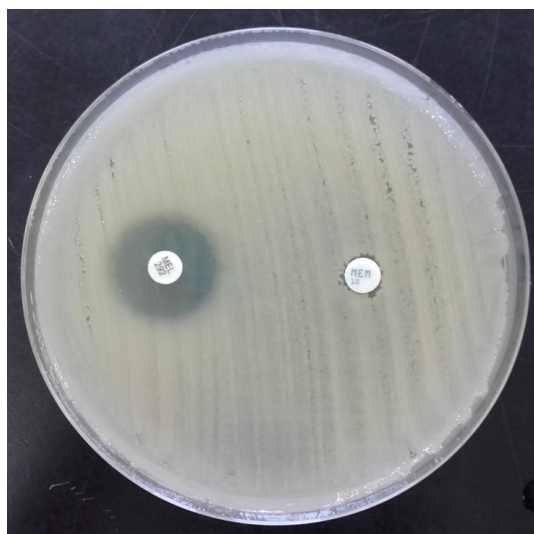
a)



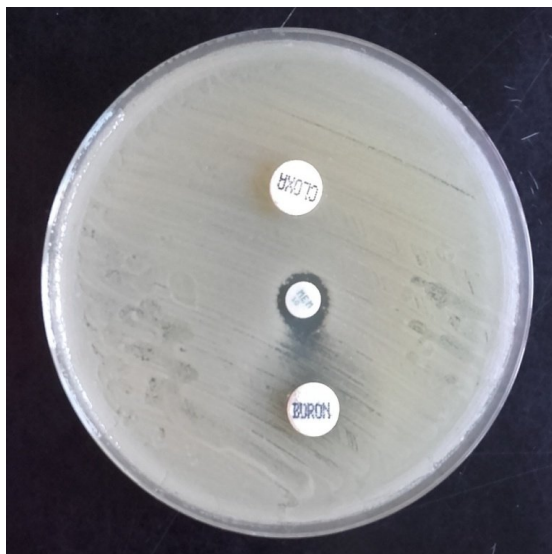
b)



Slika 10. Primer negativnog fenotipskog testa za utvrđivanje prisustva karbapenemaza: a) test sinergizma sa dva diska (DDST); b) kombinovani disk test (CDT)



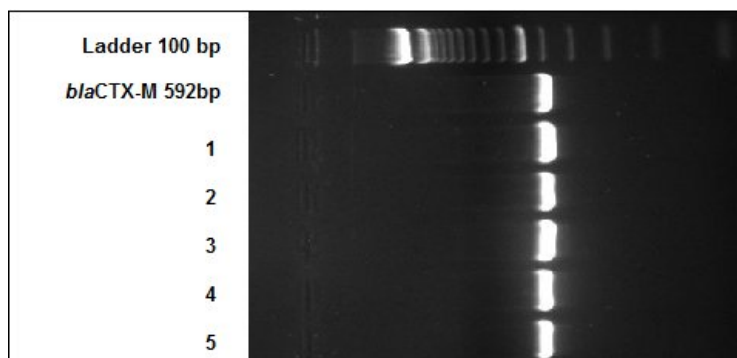
Slika 11. Primer pozitivnog fenotipskog testa za utvrđivanje prisustva karbapenemaza (CDT) koji ukazuje na prisustvo metalo-beta laktamaza



Slika 12. Primer pozitivnog fenotipskog testa za utvrđivanje prisustva karbapenemaza (DDST) koji ukazuje na prisustvo karbapenemaza iz klase A

5.2.3 Genotipsko dokazivanje produkcije CTX-M beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

Gen *bla*_{CTX-M} je dokazan kod 111 (91,7%) od testiranog 121 izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem, dok kod 10 (8,3%) nije dokazan. Na Slici 13 prikazana je elektroforeza na agaroznom gelu *bla*_{CTX-M} gena.



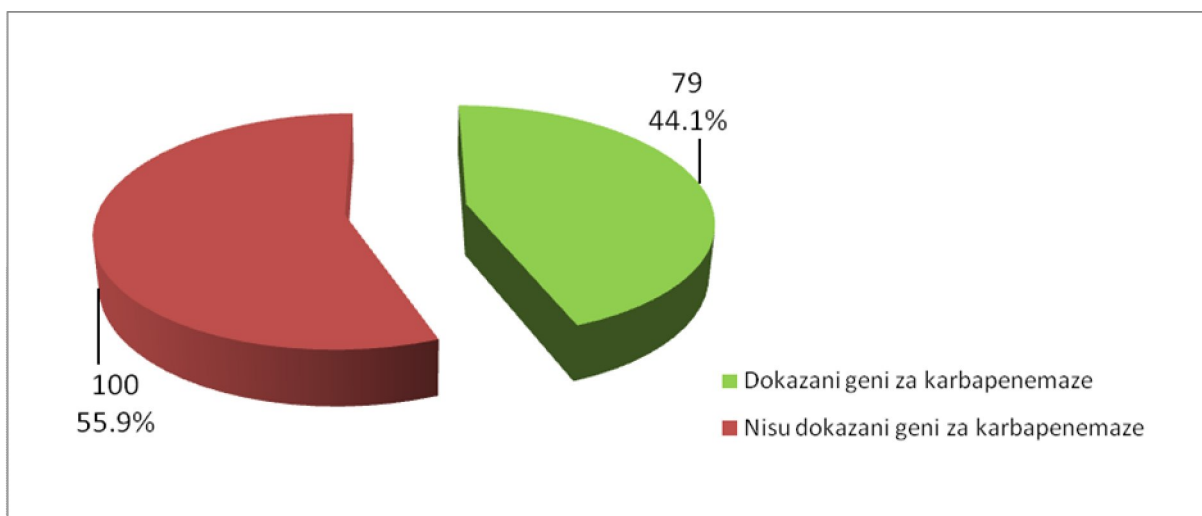
Slika 13. Detekcija *bla*_{CTX-M} gena PCR metodom

5.2.4 Genotipsko dokazivanje karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

Kod 179 izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem geni koji kodiraju karbapenemaze nađeni su kod 79 (44,1%) izolata što je prikazano na Grafikonu 4.

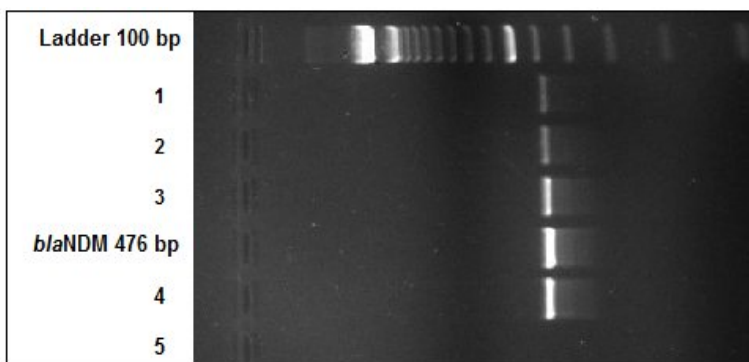
Kod izolata osetljivih na karbapeneme nije nađen ni jedan gen koji kodira karbapenemaze.

Utvrđena je statistički značajna razlika među izolatima sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem i izolata osetljivih na karbapeneme u odnosu na prisustvo gena koji kodiraju karbapenemaze ($\chi^2 = 33,092$; $p < 0,001$).

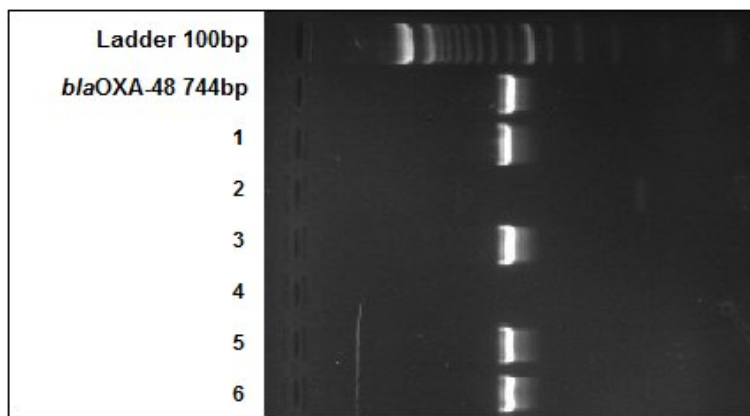


Grafikon 4. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem

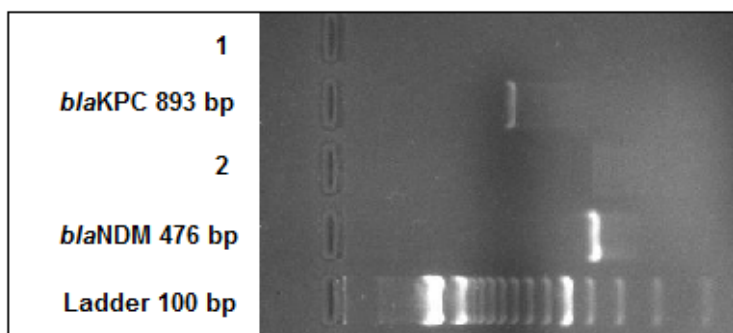
Od 79 izolata kod kojih su nađeni geni koji kodiraju karbapenemaze kod 71 (89,9%) izolata detektovan je jedan gen koji kodira karbapenemaze dok su kod 8 (10,1 %) izolata nađena 2 gena koji kodiraju karbapenemaze. Na Slici 14, 15, 16 i 17 prikazana su elektroforeze na agaroznom gelu *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC} gena, kao i pozitivna kontrola za *bla*_{VIM}.



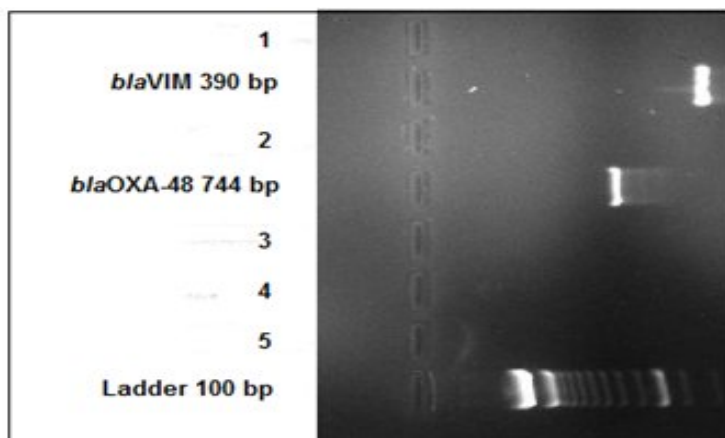
Slika 14. Detekcija *bla_{NDM}* gena PCR metodom



Slika 15. Detekcija *bla_{OXA-48-like}* gena PCR metodom



Slika 16. Detekcija *bla_{KPC}* gena PCR metodom

Slika 17. Detekcija *bla*_{VIM} gena PCR metodom

Gen *bla*_{NDM} nađen je kod 58 (32,4%) izolata, *bla*_{OXA-48-like} kod 11 (6,1%), a *bla*_{KPC} kod 2 (1,1%) izolata. Geni *bla*_{VIM} i *bla*_{IMP} nisu detektovani ni kod jednog izolata. Kod 8 (4,5%) izolata detekovana su 2 gena koja kodiraju karbapenemaze, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48-like}. Vrste detektovanih gena koji kodiraju karbapenemaze i njihova zastupljenost prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Vrsta i zastupljenost detektovanih gena koji kodiraju karbapenemaze među ispitivanim izolatima

Karbapenemaze	N	%
<i>bla</i> _{KPC}	2	1,1
<i>bla</i> _{NDM}	58	32,4
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	11	6,1
<i>bla</i> _{NDM} i <i>bla</i> _{OXA-48-like}	8	4,5
Geni nisu dokazani	100	55,9
<i>Ukupno</i>	<i>179</i>	<i>100</i>

5.3 PRIKAZ REZULTATA IZOLATA SA DOKAZANIM KARBAPENEMAZAMA

Korišćenim fenotipskim testom za dokazivanje karbapenemaza moglo je da se dokaže prisustvo metalo-beta laktamaza (klasa B), karbapenemaza iz klasa A i da se eliminiše prisustvo AmpC tipa cefalosporinaza. Od 65 izolata sa pozitivnim fenotipskim testom za dokazivanje karbapenemaza, geni koji kodiraju karbapenemaze su nađeni kod 60 (92,3%), dok kod 5 (7,7%) izolata nisu detektovani geni koji kodiraju karbapenemaze. Takođe, među 114 izolata sa negativnim fenotipskim testom kod 19 (16,7%) su dokazani geni koji kodiraju karbapenemaze. Utvrđena je statistički značajna razlika između rezultata fenotipskog testa i detekcije gena koji kodiraju karbapenemaze ($\chi^2 = 136,173$; $p < 0,001$).

Senzitivnost fenotipskog testa za dokazivanje karbapenemaza klase A i B iznosila je 100,0%, specifičnost 96,6%, a ukupna tačnost testa bila je 97,6%.

U Tabeli 8 prikazani su detektovani geni koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu pozitivnih fenotipskih testova.

Tabela 8. Prikaz detektovanih gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu pozitivnih fenotipskih testova

Vrsta fenotipskog testa	Pozitivan fenotipski test (N)	Vrsta detektovanih gena	Broj detektovanih gena (N)
EDTA	63	<i>bla</i> _{NDM}	58
		Nisu detektovani geni	5
Boronična kiselina	2	<i>bla</i> _{KPC}	2
Kloksacilin+boronična kiselina	0	/	0

Od 79 izolata kod kojih su dokazani geni koji kodiraju karbapenemaze, 68 (86,1%) izolata pripada vrsti *Klebsiella pneumoniae*, a 11 (13,9%) izolata čini *Escherichia coli*. Među genima

koji kodiraju karbapenemaze bla_{NDM} je nađen kod 58 (73,4%) izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*. Kod 11 (13,9%) izolata *Klebsiella pneumoniae* detekovani su $bla_{OXA-48-like}$ geni, a kod 2 (2,5%) izolata bla_{KPC} geni. Kod 8 (10,1%) izolata *Klebsiella pneumoniae* sa dokazanim karbapenemazama detekovana su 2 gena, bla_{NDM} i $bla_{OXA-48-like}$. Geni bla_{VIM} i bla_{IMP} nisu detektovani.

Zastupljenosti gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu bakterije kod kojih su nađeni je prikazana na Tabeli 9.

Tabela 9. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu bakterije

Dokazani geni	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
bla_{KPC}	2	0
bla_{NDM}	47	11
$bla_{OXA-48-like}$	11	0
bla_{NDM} i $bla_{OXA-48-like}$	8	0
<i>Ukupno</i>	<i>68</i>	<i>11</i>

Kod ukupno 75 izolata sa dokazanim genima koji produkuju karbapenemaze istovremeno prisustvo bla_{CTX-M} je utvrđeno kod 65 (86,7%) izolata, dok kod 10 (13,3%) izolata nisu nađeni bla_{CTX-M} geni.

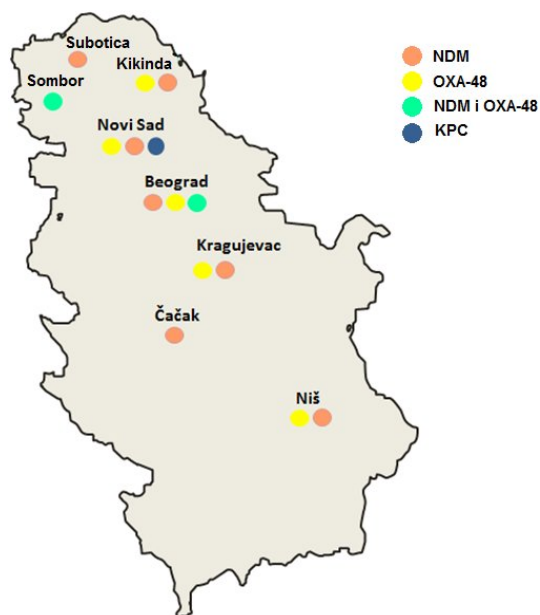
Kod 46 izolata kod kojih nisu nađeni geni koji produkuju karbapenemaze, a pokazuju smanjenu osetljivost na karbapeneme, dokazani su bla_{CTX-M} geni.

Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na grad iz kog potiču izolati prikazana je u Tabeli 10. Sremska Kamenica teritorijalno pripada Novom Sadu, te su rezultati objedinjeni i tako prikazani.

Tabela 10. Zastupljenosti gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na grad iz kog potiču izolati

Dokazani geni	bla_{KPC}	bla_{NDM}	$bla_{OXA-48-like}$	bla_{NDM} i $bla_{OXA-48-like}$
Beograd	0	8	4	7
Čačak	0	1	0	0
Kikinda	0	8	1	0
Kragujevac	0	2	4	0
Niš	0	8	1	0
Novi Sad	2	30	1	0
Sombor	0	0	0	1
Subotica	0	1	0	0
<i>Ukupno</i>	<i>2</i>	<i>58</i>	<i>11</i>	<i>8</i>

Na Slici 18 je dat slikovni prikaz zastupljenosti detekovanih vrsta gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na grad iz kog potiču izolati.



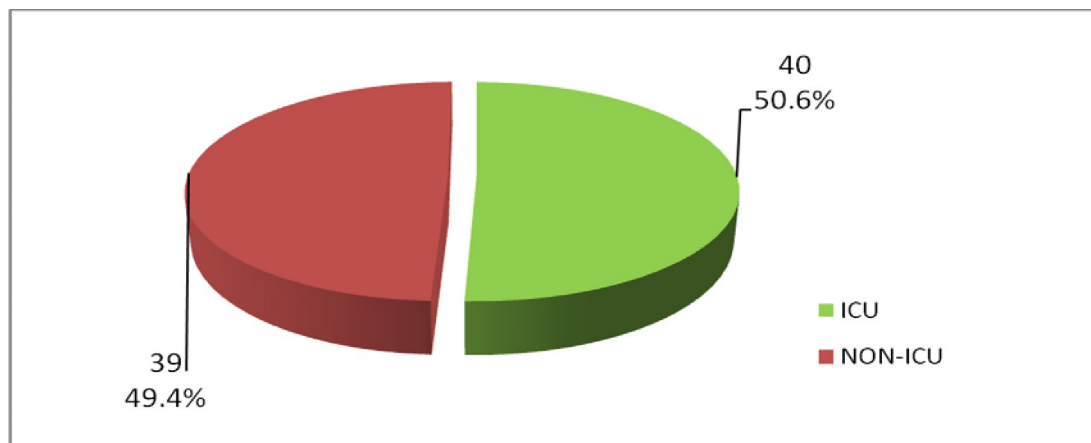
Slika 18. Slikovni prikaz zastupljenosti detekovanih vrsta gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na grad iz kog potiču izolati

Posmatrano u odnosu na vrstu materijala iz kog su izolovani multirezistentni izolati sa dokazanim genima koji kodiraju karbapenemaze bilo je 40 (50,6%) uzoraka urina, 18 (22,8%) uzoraka sekreta iz donjeg respiratornog trakta, 12 (15,2%) uzoraka krvi i 9 (11,4%) sekreta rana. U Tabeli 11 prikazana je zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu materijala iz kog potiču izolati.

Tabela 11. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na vrstu materijala

Klinički uzorak	Geni	N	%
Urin		40	50,6
Sekret iz donjeg respiratornog trakta		18	22,8
Krv		12	15,2
Sekret rana		9	11,4
Punktati		0	0
<i>Ukupno</i>		<i>79</i>	<i>100</i>

U vreme uzorkovanja pacijenti su bili smešteni ili na kliničkim odeljenjima ili u jedinicama intenzivne nege. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na odeljenje na kom su pacijenti bili smešteni u vreme uzorkovanja prikazana je Grafikonu 5. Nije utvrđena statistički značajna razlika između detekcije gena koji kodiraju karbapenemaze i odeljenja na kom su pacijenti bili smešteni u vreme uzorkovanja ($\chi^2 = 1,021$; $p=0,312$).



Grafikon 5. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze u odnosu na odeljenje

5.3.1 Prikaz osetljivosti izolata koji produkuju karbapenemaze

U Tabeli 12 su prikazani rezultati ispitivanja osetljivosti disk difuzionim metodom kod izolata koji produkuju karbapenemaze (N=79).

Tabela 12. Osetljivost izolata koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Ampicilin	0	0	100
Amoksicilin sa klavulanatom	0	0	100
Ceftazolin	0	0	100
Ceftriakson	0	0	100
Cefuroksim	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Cefepim	0	1,3	98,7
Piperacilin/tazobaktam	0	1,3	98,7
Gentamicin	0	3,8	96,2
Trimetoprim/sulfametoksazol	6,3	0	93,7
Ciprofloksacin	6,3	1,3	92,4
Imipenem	0	17,7	82,3
Amikacin	22,8	15,2	62

Karbapenemaze su dokazane kod 74,5% izolata sa smanjenom osetljivošću (I+R) na meropenem, korišćenjem disk difuzione metode za određivanje osetljivosti, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na meropenem (senzitivnost 100%, specifičnost 87,8%, ukupna tačnost 91,0%). Karbapenemaze su dokazane kod 89,8% izolata sa smanjenom osetljivošću (I+R) na imipenem korišćenjem disk difuzione metode za određivanje osetljivosti, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na imipenem (senzitivnost 100%, specifičnost 96,4%, ukupna tačnost 97,1%).

Karbapenemaze su dokazane kod 40,3% izolata sa smanjenom osetljivošću (I+R) na ertapenem korišćenjem disk difuzione metode za određivanje osetljivosti, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na ertapenem (senzitivnost 100%, specifičnost 47,0%, ukupna tačnost 61,0%).

U Tabeli 13 su prikazani rezultati ispitivanja osetljivosti automatizovanim Vitek 2 sistemom kod izolata koji produkuju karbapenemaze (N=79).

Tabela 13. Osetljivost izolata koji produkuju karbapenemaze određena Vitek 2 sistemom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Ampicilin	0	0	100
Piperacilin	0	0	100
Piperacilin/tazobaktam	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Tobramicin	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Aztreonam	1,3	0	98,7
Ceftriakson	0	2,5	97,5
Gentamicin	3,8	0	96,2
Imipenem	0	6,3	93,7
Ciprofloksacin	7,6	0	92,4
Levofloksacin	7,6	0	92,4
Trimetoprim/sulfametoksazol	8,9	0	91,1
Cefepim	0	16,5	83,5
Amikacin	29,1	27,8	43,0
Kolisitin	94,9	0	5,1
Tigeciklin	71,4	11,1	17,5
Fosfomicin	92,4	0	7,6

Karbapenemaze su dokazane kod 94,0% izolata sa smanjenom osetljivošću (I+R) na meropenem korišćenjem Vitek 2 sistema koji se bazira na dilucionoj metodi za određivanje osetljivosti na meropenem, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na meropenem (senzitivnost 100%, specifičnost 90,2%, ukupna tačnost 96,1%).

Karbapenemaze su dokazane kod 95,2% izolata sa smanjenom osetljivošću (I+R) na imipenem korišćenjem Vitek 2 sistema za određivanje osetljivosti na imipenem, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na imipenem (senzitivnost 100%, specifičnost 92,2%, ukupna tačnost 96,9%).

Karbapenemaze su dokazane kod 62,9% izolata smanjenom osetljivošću (I+R) na ertapenem korišćenjem Vitek 2 sistema za određivanje osetljivosti na ertapenem, a nisu dokazane kod 100,0% izolata osetljivih na ertapenem (senzitivnost, specifičnost i ukupna tačnost nisu prikazane zbog izuzetno malo testiranih izolata koji su bili osetljivi na ertapenem).

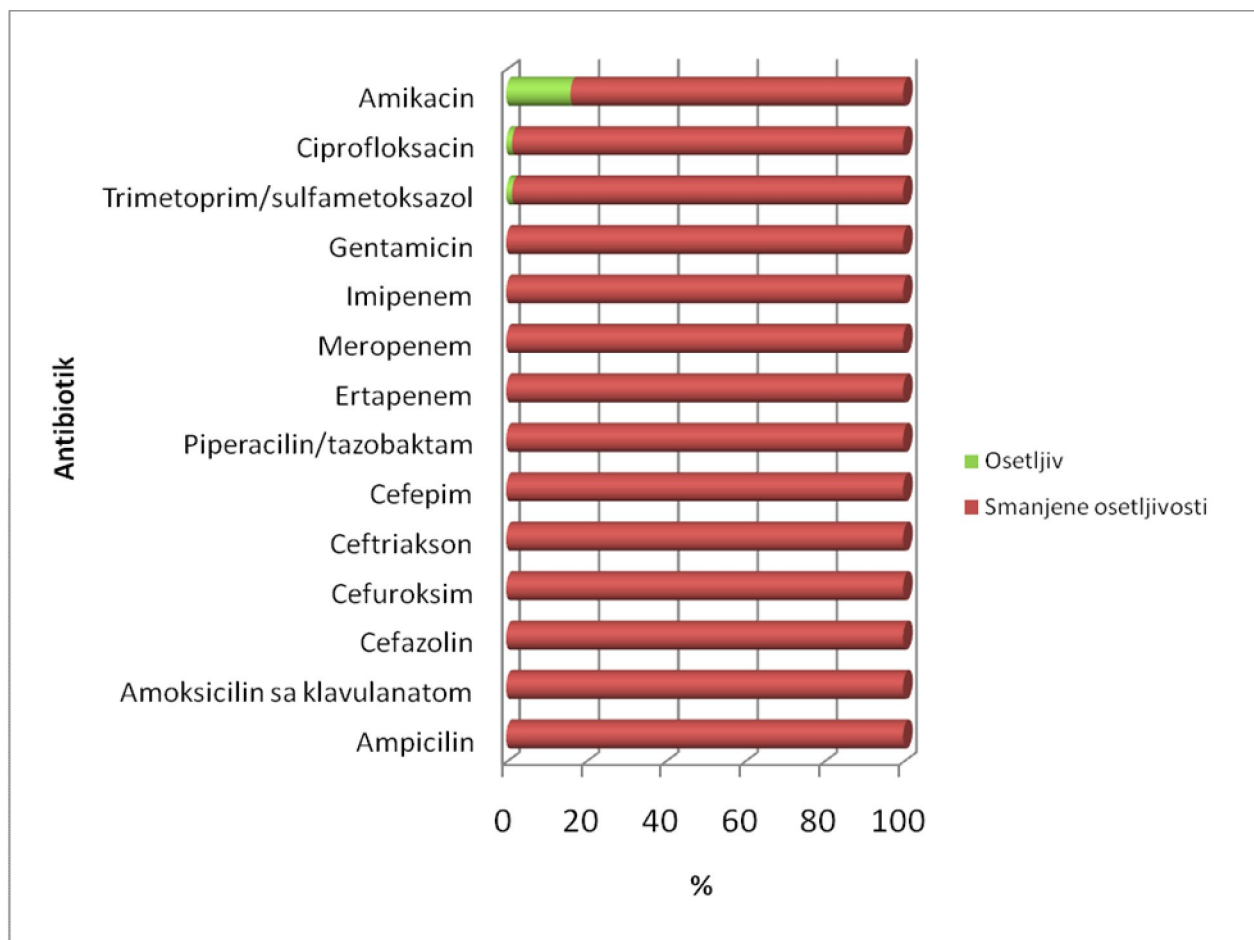
5.3.2 Prikaz osetljivosti izolata koji produkuju karbapenemaze u odnosu na izolovanu vrstu

Osetljivost 68 (86,1%) izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom prikazana je u Tabeli 14.

Tabela 14. Osetljivost *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Ampicilin	0	0	100
Amoksicilin sa klavulanatom	0	0	100
Cefazolin	0	0	100
Ceftriakson	0	0	100
Cefuroksim	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Cefepim	0	1,5	98,5
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,5	0	98,5
Ciprofloksacin	1,5	0	98,5
Piperacilin/tazobaktam	0	1,5	98,5
Gentamicin	0	4,4	95,6
Imipenem	0	19,1	80,9
Amikacin	16,2	16,2	67,6

Prema interpretaciji antibiograma klinički efikasan antimikrobni lek u standardom doznom režimu pripada samo kategoriji S (osetljiv). Na Grafikonu 6 je prikazana osetljivost izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R).



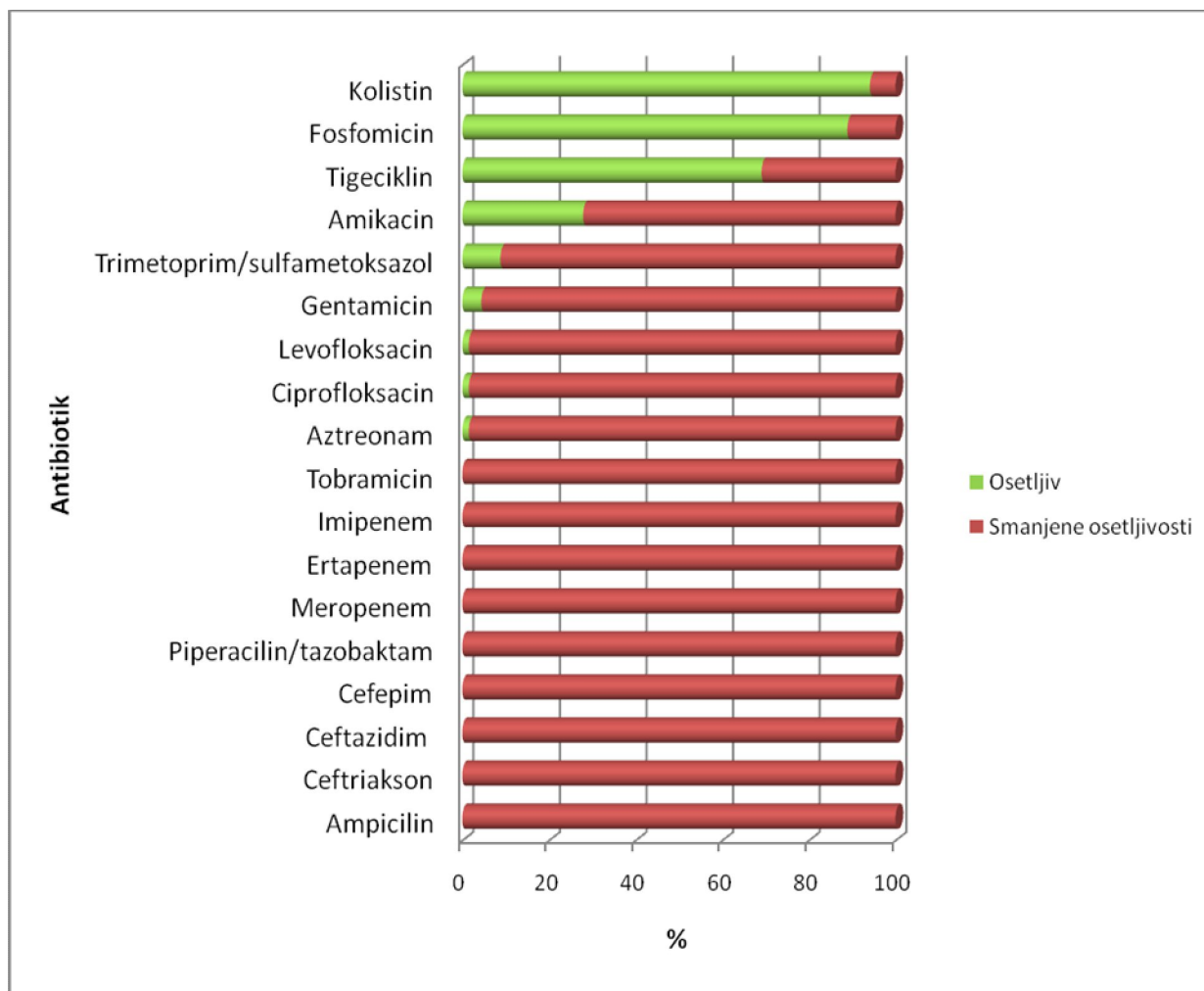
Grafikon 6. Osetljivost izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R)

U Tabeli 15 je prikazana osetljivost 68 izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom.

Tabela 15. Osetljivost *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Piperacilin/tazobaktam	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Ampicilin	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Tobramicin	0	0	100
Aztreonam	1,5	0	98,5
Ciprofloksacin	1,5	0	98,5
Levofloksacin	1,5	0	98,5
Ceftriakson	0	2,9	97,1
Gentamicin	4,4	0	95,6
Imipenem	0	5,9	94,1
Trimetoprim/sulfametoksazol	8,8	0	91,2
Cefepim	0	8,8	91,2
Amikacin	27,9	27,9	44,1
Tigeciklin	69,1	10,9	20,0
Fosfomicin	88,9	0	11,1
Kolistin	94,1	0	5,9

Na Grafikonu 7 je prikazana osetljivost izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R).



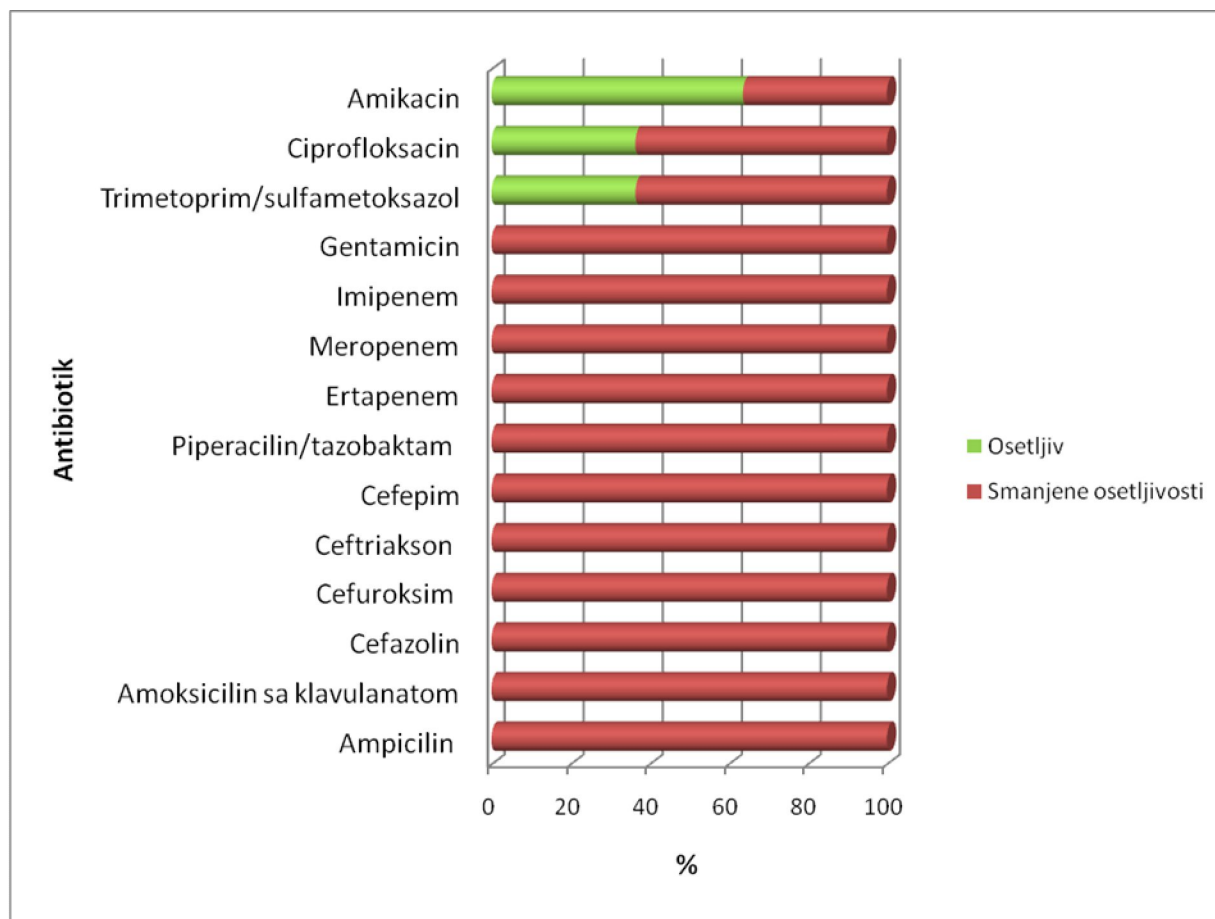
Grafikon 7. Osetljivost izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R)

U Tabeli 16 je prikazana osetljivost 11 (13,9%) izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom.

Tabela 16. Osetljivost *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Ampicilin	0	0	100
Amoksicilin sa klavulanatom	0	0	100
Piperacilin/tazobaktam	0	0	100
Cefazolin	0	0	100
Ceftriakson	0	0	100
Cefuroksim	0	0	100
Cefepim	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Gentamicin	0	0	100
Imipenem	0	9,1	90,9
Trimetoprim/sulfametoksazol	36,4	0	63,6
Ciprofloksacin	36,4	9,1	54,5
Amikacin	63,6	9,1	27,3

Na Grafikonu 8 je prikazana osetljivost 11 izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R).



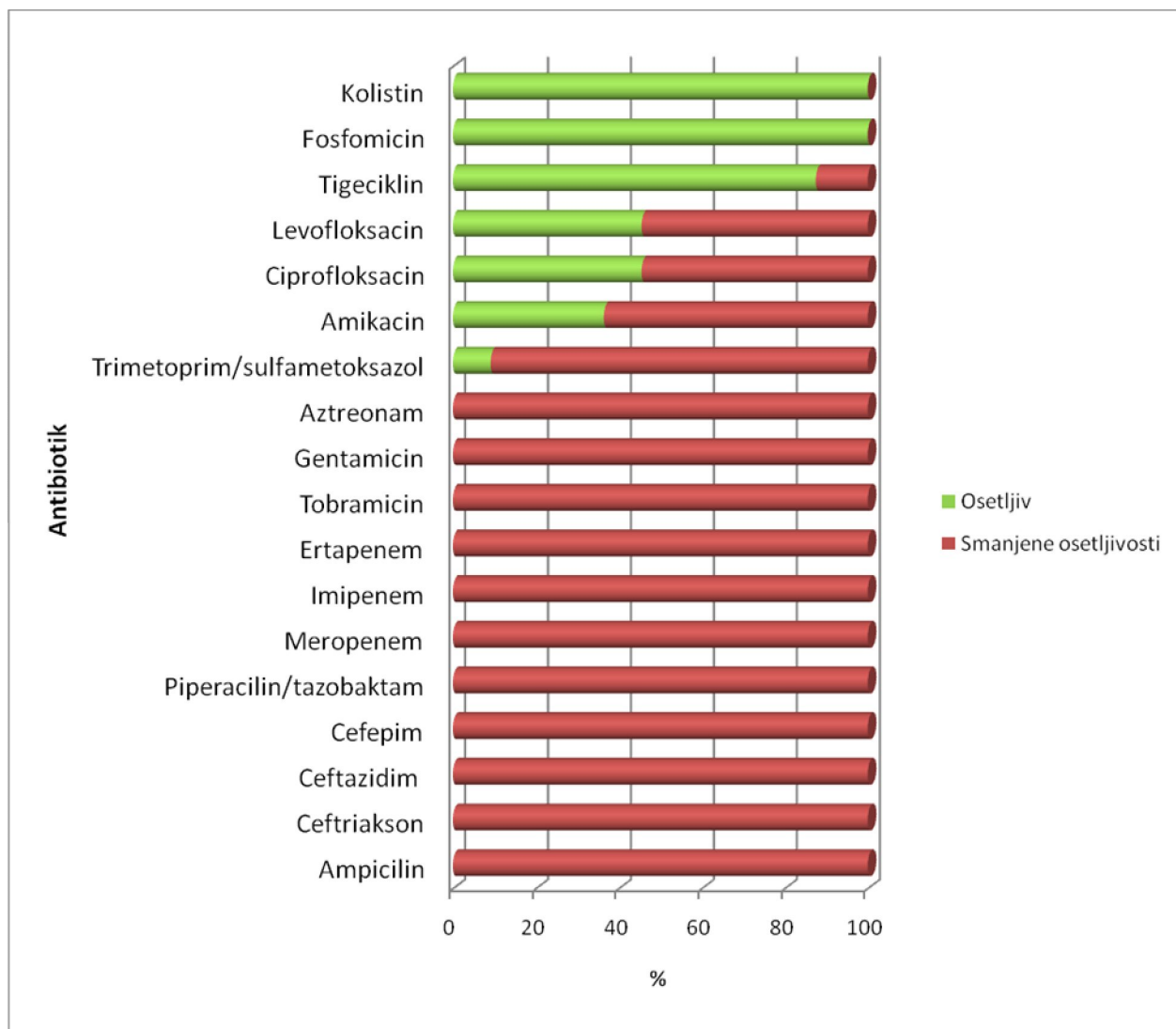
Grafikon 8. Osetljivost izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena disk difuzionim metodom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R)

U Tabeli 17 je prikazana osetljivost 11 izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena Vitek 2 sistemom (N=11).

Tabela 17. Osetljivost *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom

Testirani antibiotik	Osetljiv (S) %	Umereno osetljiv (I) %	Rezistentan (R) %
Piperacilin/tazobaktam	0	0	100
Ceftazidim	0	0	100
Aztreonam	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Gentamicin	0	0	100
Tobramicin	0	0	100
Ampicilin	0	0	100
Ceftriakson	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Imipenem	0	9,1	90,9
Trimetoprim/sulfametoksazol	9,1	0	90,9
Ciprofloksacin	45,5	0	54,5
Levofloksacin	45,5	0	54,5
Amikacin	36,4	27,3	36,4
Cefepim	0	63,6	36,4
Tigeciklin	87,5	12,5	0
Fosfomicin	100	0	0
Kolistin	100	0	0

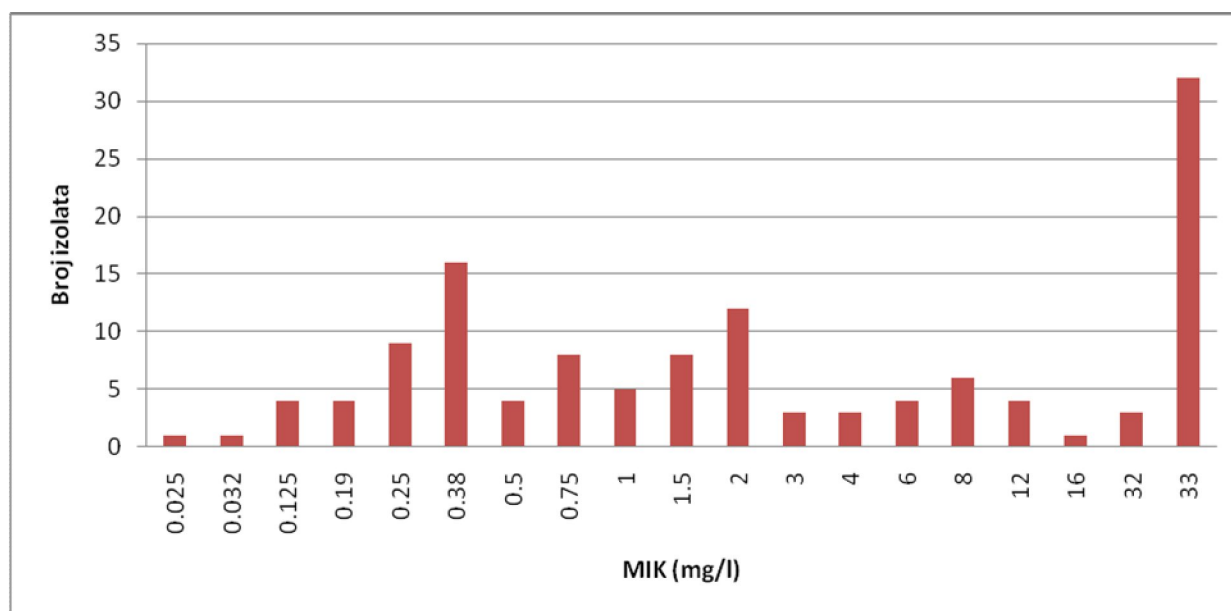
Na Grafikonu 9 je prikazana osetljivost izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R).



Grafikon 9. Osetljivost izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze određena automatizovanim Vitek 2 sistemom sa objedinjenim kategorijama umereno osetljiv (I) i rezistentan (R)

5.4 VREDNOSTI MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA KARBAPENEMA I NJIHOVA INTERPRETACIJA KORIŠĆENJEM EUCAST I CLSI STANDARDA

Određene su minimalne inhibitorne koncentracije za karbapeneme (imipenem, meropenem, ertapenem) gradijent testom kod izolata koji su prema disk difuzionoj metodi bili rezistentni na bar jedan testirani karbapenem (N=128). Distribucija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem prikazana je na Grafikonu 10.



Grafikon 10. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem dobijenih gradijent testom (N=128)

U zavisnosti od korišćenog standarda dobijene vrednosti se mogu svrstati u određene kategorije (osetljiv, umereno osetljiv, rezistentan). Izvršena je interpretacija prema 2 standarda, CLSI i EUCAST. U Tabeli 18 su prikazane vrednosti MIK i odgovarajuće kategorije osjetljivosti na osnovu kojih je vršena interpretacija vrednosti MIK ispitivanih izolata dobijenih gradijent testom.

Tabela 18. Vrednosti MIK i odgovarajuće kategorije osjetljivosti korišćenih standarda

Standard	Karbapenem	S (MIK mg/l)	I (MIK mg/l)	R (MIK mg/l)
CLSI	Meropenem	≤ 1	2	≥ 4
	Imipenem	≤ 1	2	≥ 4
	Ertapenem	$\leq 0,5$	1	≥ 2
EUCAST	Meropenem	≤ 2	/	> 8
	Imipenem	≤ 2	/	> 8
	Ertapenem	$\leq 0,5$	/	> 1

Interpretacija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem korišćenjem CLSI standarda je prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem korišćenjem CLSI standarda

CLSI	S	I	R
Meropenem	52 40,6%	23 18,0 %	53 41,4%

U Tabeli 20 je prikazana interpretacija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem korišćenjem EUCAST standarda.

Tabela 20. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem korišćenjem EUCAST standarda

EUCAST	S	I	R
Meropenem	72 56,2%	10 7,8%	46 36,0%

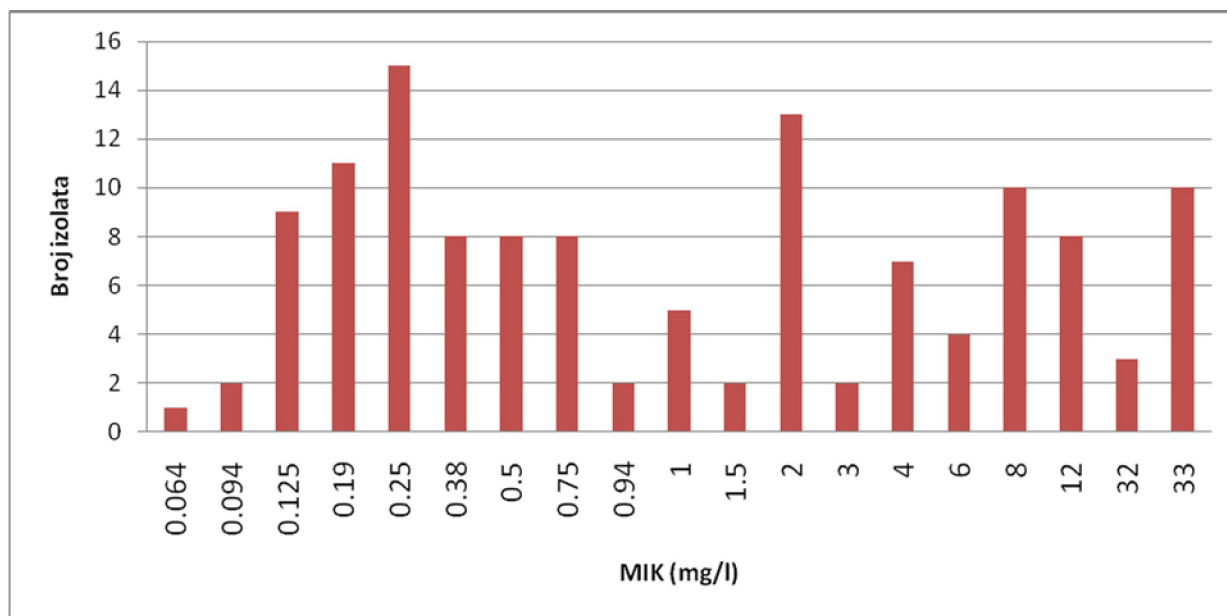
Kappa vrednost (Cohen test) je 0,653 što ukazuje na dobro slaganje interpretacije osetljivosti za meropenem po CLSI standardu i interpretacije po EUCAST standardu. Procenat slaganja je 78,9%.

Vrednost McNemar testa je $p < 0,001$, što pokazuje nesimetričnost u odstupanju u odnosu na slaganje, prema kategoriji S (osetljiv) EUCAST standarda u odnosu na CLSI standard.

Kada je interpretacija osetljivosti izvršena po CLSI standardu, karbapenemaze su dokazane kod 89,5% izolata rezistentnih na meropenem, a nisu dokazane kod 78,8% izolata osetljivih na meropenem (senzitivnost 86,1%, specifičnost 83,7%, ukupna tačnost 85,1%).

Kada je interpretacija osetljivosti izvršena po EUCAST standardu, karbapenemaze su dokazane kod 92,9% izolata rezistentnih na meropenem, a nisu dokazane kod 62,5% izolata osetljivih na meropenem (senzitivnost 65,8%, specifičnost 91,8%, ukupna tačnost 75,8%).

Distribucija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem prikazana je na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem dobijenih gradijent testom (N=128)

U Tabeli 21 je prikazana interpretacija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem korišćenjem CLSI standarda.

Tabela 21. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem korišćenjem CLSI standarda

CLSI	S	I	R
Imipenem	69 53,9%	15 11,7%	44 34,3%

U Tabeli 22 je prikazana interpretacija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem korišćenjem EUCAST standarda.

Tabela 22. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za imipenem korišćenjem EUCAST standarda

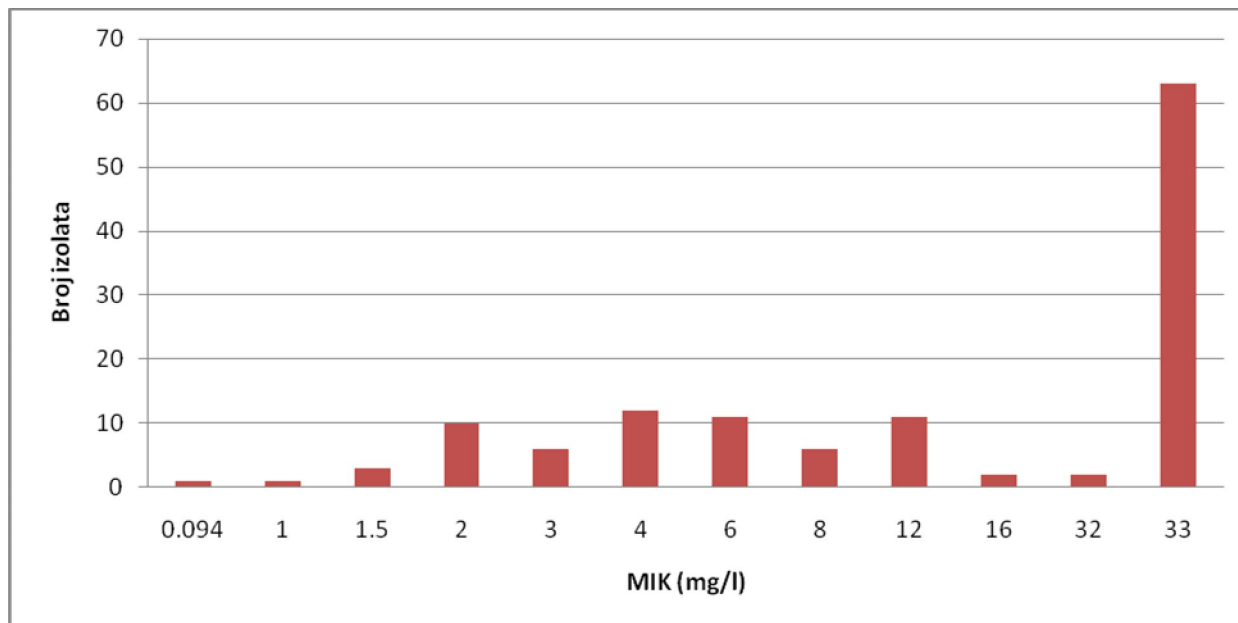
EUCAST	S	I	R
Imipenem	84 65,6%	13 10,2%	31 24,2%

Kappa vrednost (Cohen test) je 0,617 što ukazuje na dobro slaganje interpretacije osetljivosti za imipenem po CLSI standardu i interpretacije po EUCAST standardu. Procenat slaganja je 78,9%. Vrednost McNemar testa je $p < 0,001$, što pokazuje nesimetričnost u odstupanju u odnosu na slaganje, prema kategoriji S (osetljiv) EUCAST standarda u odnosu na CLSI standard.

Kada je interpretacija osetljivosti izvršena po CLSI standardu, karbapenemaze su dokazane kod 94,9% izolata rezistentnih na imipenem, a nisu dokazane kod 66,7% izolata osetljivih na imipenem (senzitivnost 70,9%, specifičnost 93,9%, ukupna tačnost 79,7%).

Kada je interpretacija osetljivosti izvršena po EUCAST standardu, karbapenemaze su dokazane kod 97,7% izolata rezistentnih na imipenem, a nisu dokazane kod 57,1% izolata osetljivih na imipenem (senzitivnost 54,4%, specifičnost 98,0%, ukupna tačnost 71,1%).

Distribucija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za ertapenem prikazana je na Grafikonu 12.



Grafikon 12. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za ertapenem dobijenih gradijent testom (N=128)

U Tabeli 23 je prikazana interpretacija vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za ertapenem korišćenjem EUCAST i CLSI standarda, budući da su rezultati isti.

Tabela 23. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za ertapenem korišćenjem EUCAST i CLSI standarda

EUCAST/CLSI	S	R
Ertapenem	1 0,8%	127 99,2%

Karbapenemaze su dokazane kod 62,2% izolata rezistentnih na ertapenem.

5.5 MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ISPITIVANIH ANTIBAKTERIJSKIH LEKOVA KOD IZOLATA SA DOKAZANOM PRODUKCIJOM KARBAPENEMAZA I BEZ DOKAZANE PRODUKCIJE KARBAPENEMAZA

Kod svih izolata iz grupe koja produkuje karbapenemaze i koja ne produkuje karbapenemaze vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za **ampicilin** (MIK \geq 32 mg/l), **piperacilin** (MIK \geq 128 mg/l), **ceftazidim** (MIK \geq 64 mg/l) su bile jednake.

U grupi sa dokazanim karbapenemazama sve vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za **piperacilin/tazobaktam** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom su bile jednake (MIK \geq 128). U grupi bez dokazanih karbapenemaza srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za piperacilin/tazobaktam određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom je 125,2 mg/l (SD=19; opseg: 32-129). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,077$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **ceftriakson** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 62,8 mg/l (SD=7,6; opseg: 16,0-64,0), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza sve vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija su bile jednake MIK=64,0 mg/l. Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,254$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **cefepim** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanim produkcijom karbapenemaza je 8,3 mg/l (SD=6,7; opseg: 2-16), a u grupi bez dokazane produkcije iznosi 14 mg/l (SD=4; opseg: 2-16). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,125$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

U grupi sa dokazanim karbapenemazama sve vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za **tobramicin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom su bile jednake (MIK=8 mg/l). U grupi bez dokazanih karbapenemaza srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za tobramicin određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom je 5,7 mg/l (SD=4; opseg: 1-8). Ne

postoji statistički značajna razlika ($p=0,127$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **ciprofloksacin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 3,6 mg/l (SD=1; opseg: 0,25-4), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 3,9 mg/l (SD=0,5; opseg: 0,25-4). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,114$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **levofloksacin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 7,2 mg/l (SD=2,3; opseg: 0,12-8), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 7,7 mg/l (SD=1,2; opseg: 0,12-8). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,132$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **trimetoprim/sulfametoksazol** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 294,4 mg/l (SD=82,5; opseg: 20,0-320,0), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 268,2 mg/l (SD=113,0 opseg: 20,0-320,0). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,123$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **fosfomicin** određenih gradijent testom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 38,3 mg/l (SD=73,5; opseg: 1,5-257,0), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 52,9 mg/l (SD=89,0; opseg: 2,0-257,0). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,274$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **kolistin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 1,3 mg/l (SD=3,4; opseg: 0,5-16), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza sve vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija su bile jednake MIK=0,5 mg/l. Ne postoji statistički značajna razlika

($p=0,122$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **tigeciklin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 2,9 mg/l (SD=2,5; opseg: 0,5-8,0), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 2,0 mg/l (SD=2,6 opseg: 0,5-8,0). Ne postoji statistički značajna razlika ($p=0,239$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

Kod izolata sa dokazanim karbapenemazama i izolata kod kojih nisu dokazane karbapenemaze **nije utvrđena** statistički značajna razlika u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija za **ampicilin, piperacilin, piperacilin/tazobactam, ceftriakson, ceftazidime, cefepim, tobramicin, ciprofloksacin, levofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol, fosfomicin, kolistin i tigeciklin**.

Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **imipenem** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanim produkcijom karbapenemaza je 13 mg/l (SD=5,7; opseg: 1-17), a u grupi bez dokazane produkcije iznosi 0,9 mg/l (SD=3,3; opseg: 1-17). Postoji statistički značajna razlika ($p<0,001$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

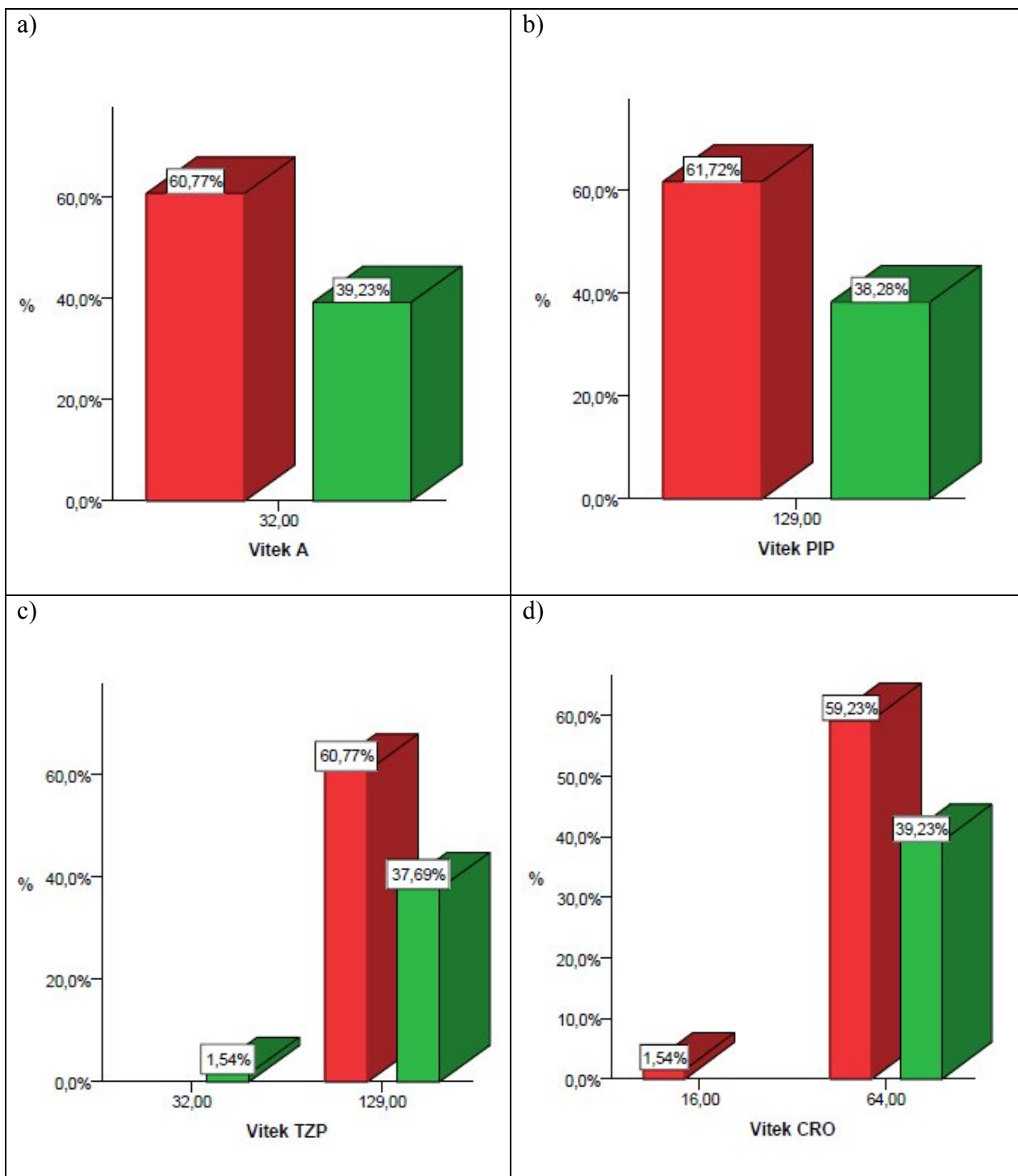
Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **meropenem** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanim produkcijom karbapenemaza je 15,7 mg/l (SD=3,3; opseg: 4-17), a u grupi bez dokazane produkcije iznosi 1,1 mg/l (SD=3,3; opseg: 4-17). Postoji statistički značajna razlika ($p<0,001$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

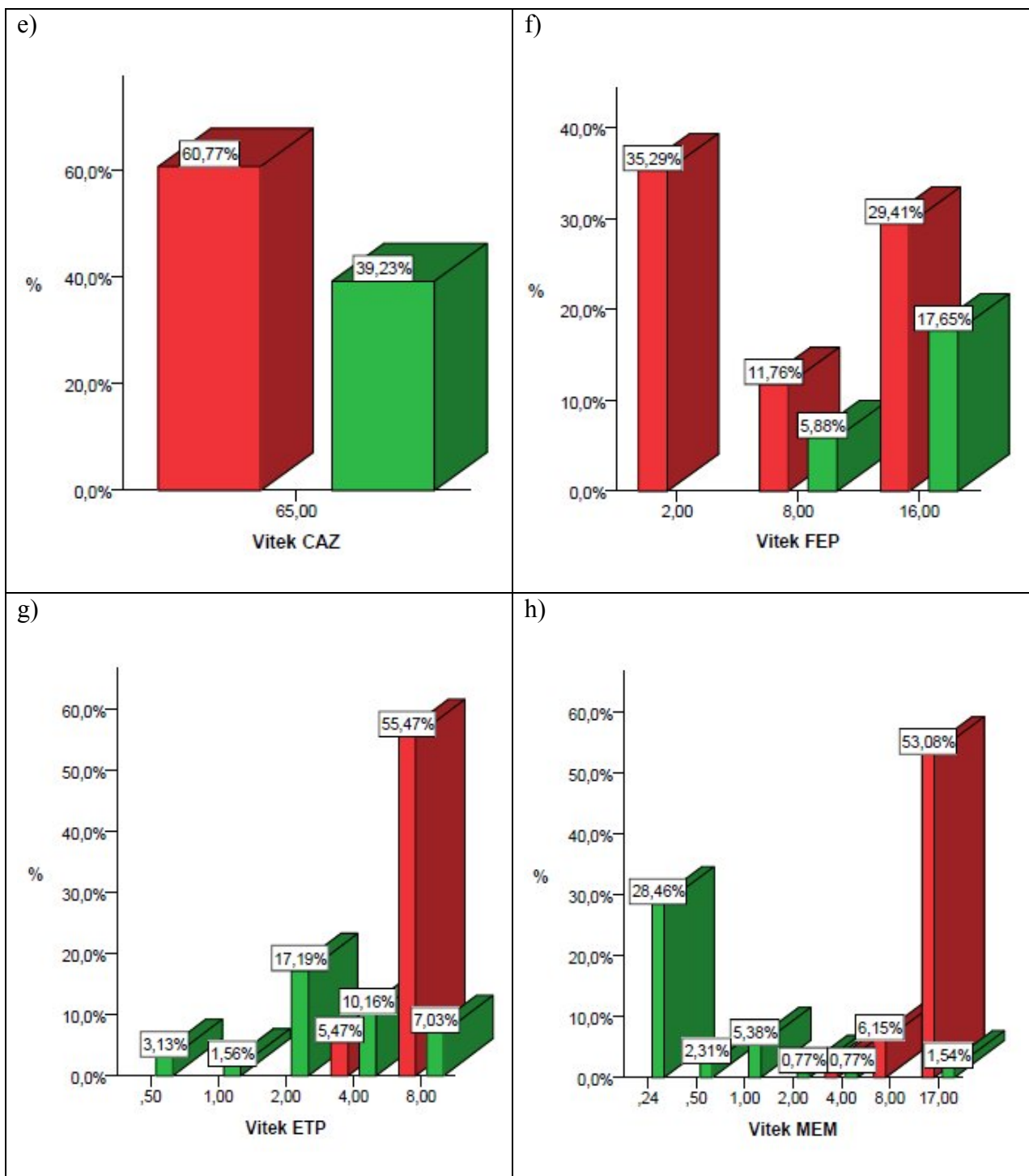
Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **ertapenem** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 7,6 mg/l (SD=1,2; opseg: 4,0-8,0), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 3,4 mg/l (SD=113,0 opseg: 0,5-8,0). Postoji statistički značajna razlika ($p<0,001$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

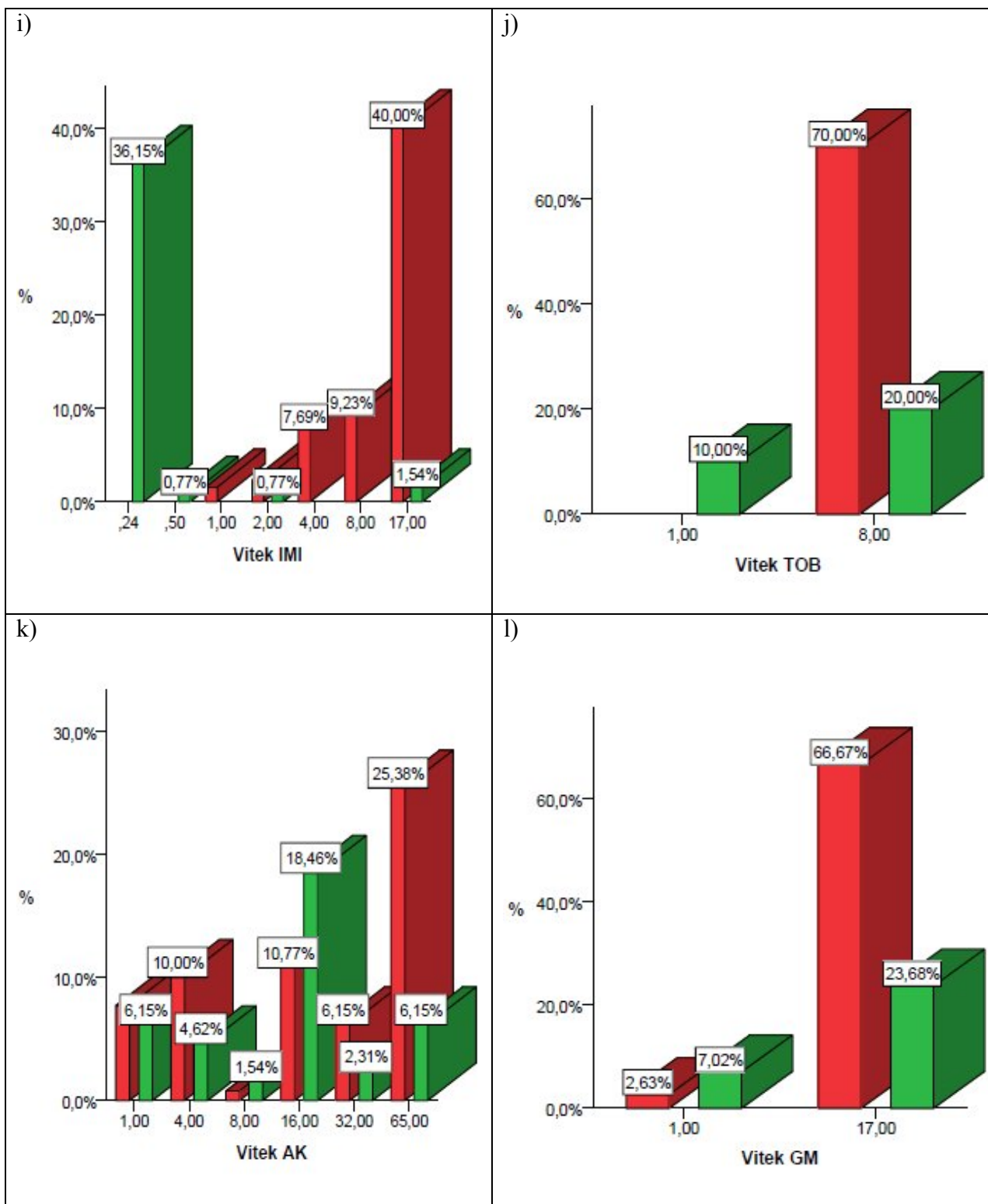
Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **amikacin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 34,1 mg/l (SD=27,6; opseg: 1-65), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 20,5 mg/l (SD=20,8; opseg: 1-65). Postoji statistički značajna razlika ($p=0,024$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

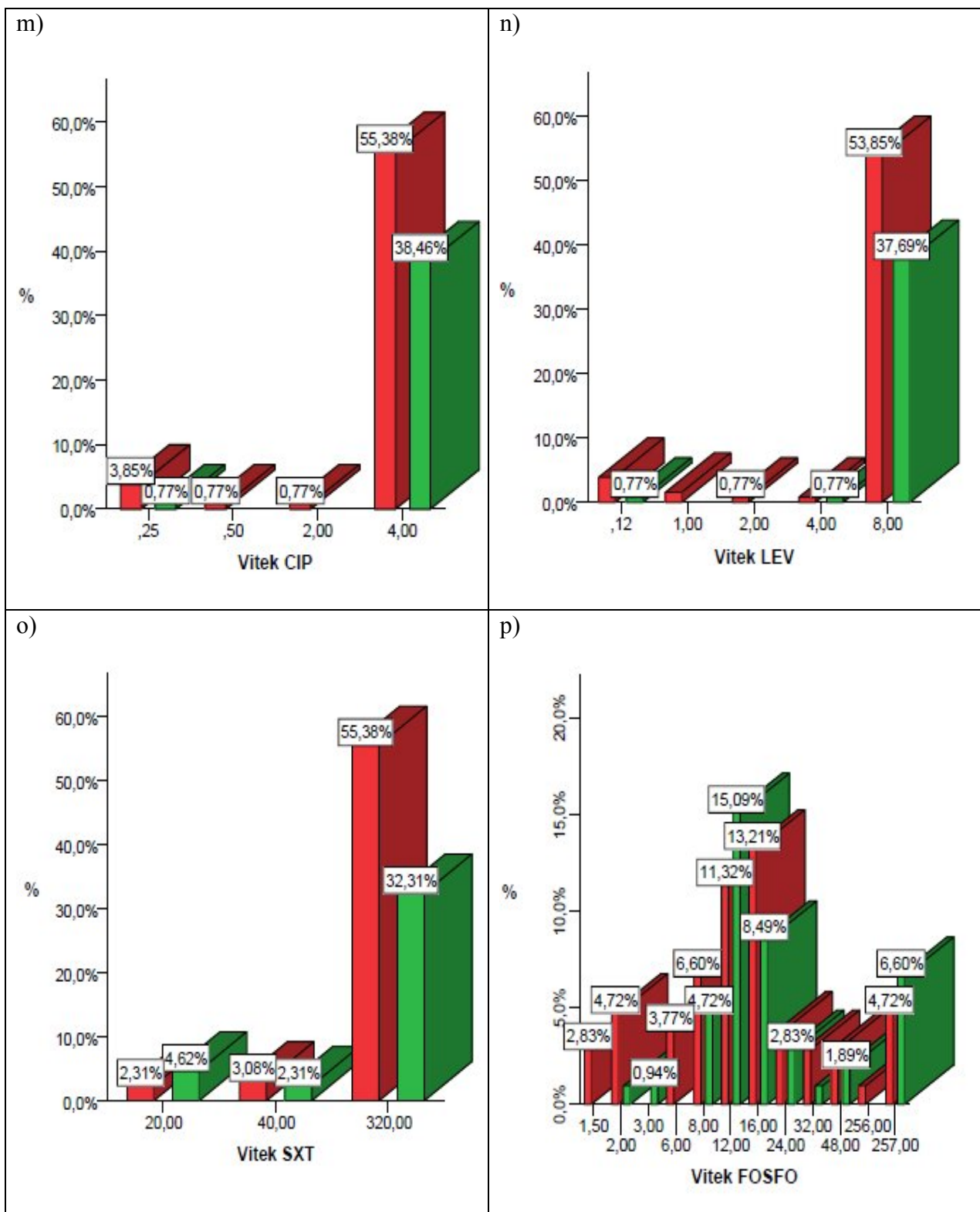
Srednja vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija za **gentamicin** određenih automatizovanim Vitek 2 sistemom u grupi sa dokazanom produkcijom karbapenemaza je 16,4 mg/l (SD=3,1; opseg: 1-17), a u grupi bez dokazane produkcije karbapenemaza iznosi 13,3 mg/l (SD=6,8; opseg: 1-17). Postoji statistički značajna razlika ($p=0,002$, Mann-Whitney U) u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija u odnosu na dokazanu produkciju karbapenemaza.

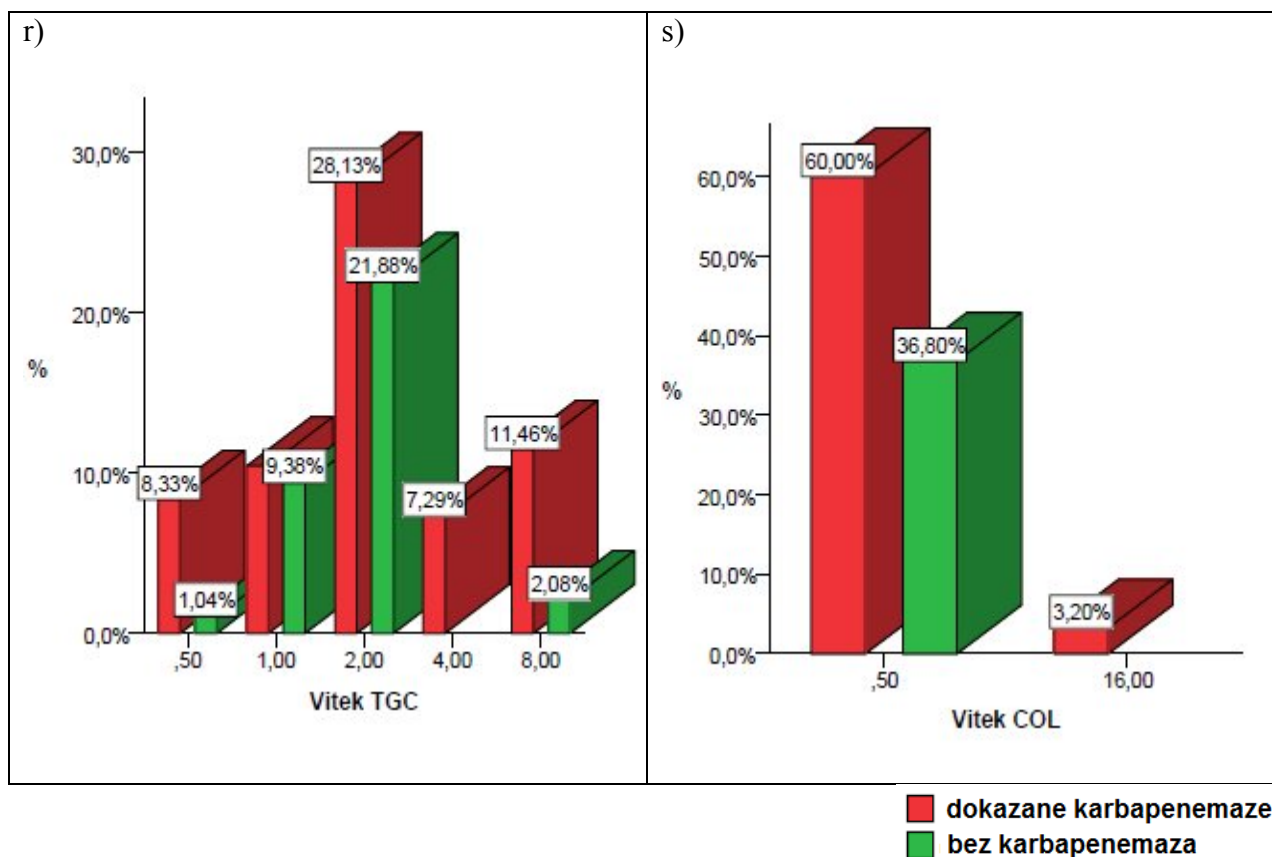
Kod izolata sa dokazanim karbapenemazama i izolata kod kojih nisu dokazane karbapenemaze **utvrđena je** statistički značajna razlika u vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija za **imipenem, meropenem, ertapenem, amikacin i gentamicin**.







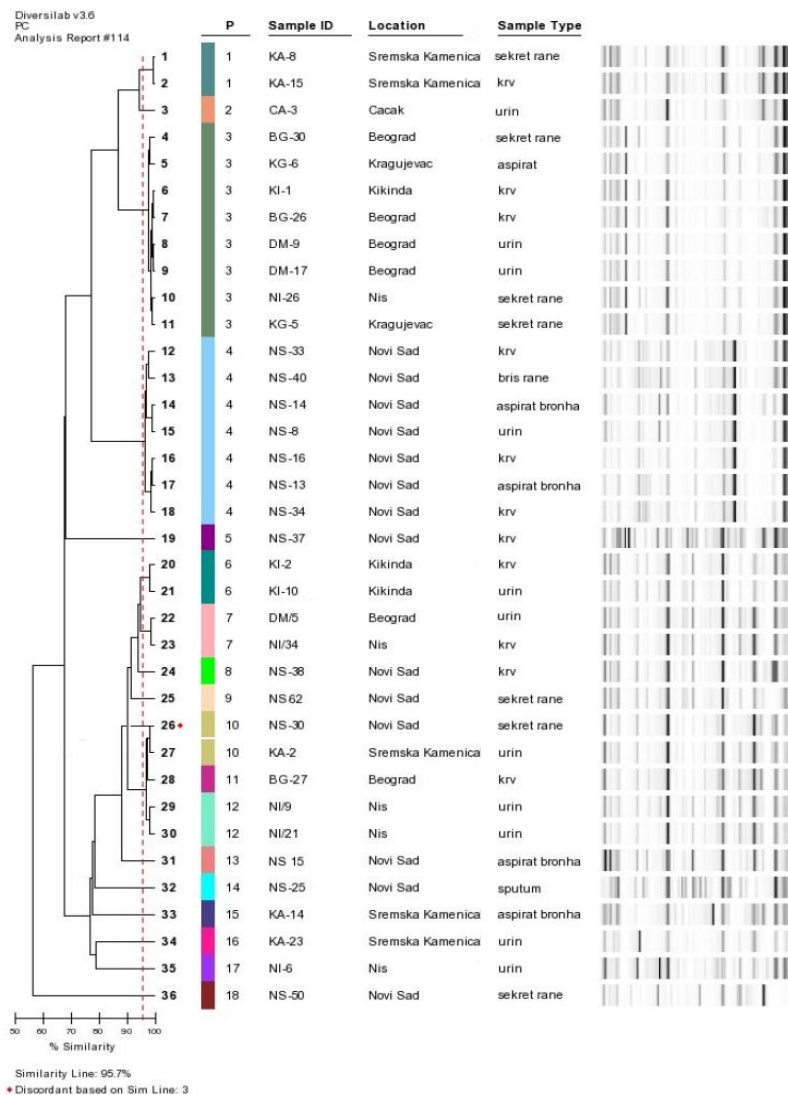




Grafikon 13. Grafički prikaz minimalnih inhibitornih koncentracija ispitivanih antibakterijskih lekova izolata sa dokazanom produkcijom karbapenemaza i bez dokazane produkcije karbapenemaza: a) ampicilin (Vitek A); b) piperacilin (Vitek PIP); c) piperacilin/tazobaktam (Vitek TZP); d) ceftriakson (Vitek CRO); e) ceftazidim (Vitek CAZ); f) cefepim (Vitek FEP); g) ertapenem (Vitek ETP); h) meropenem (Vitek MEM); i) imipenem (Vitek IMI); j) tobramicin (Vitek TOB); k) gentamicin (Vitek GM); l) amikacin (Vitek AK); m) ciprofloksacin (Vitek CIP); n) levofloksacin (Vitek LEV); o) trimetoprim/sulfametoksazol (Vitek SXT); p) fosfomicin (Vitek FOSFO); r) tigeciklin (Vitek TGC); s) kolistin (Vitek COL)

5.6 GENOTIPIZACIJA IZOLATA

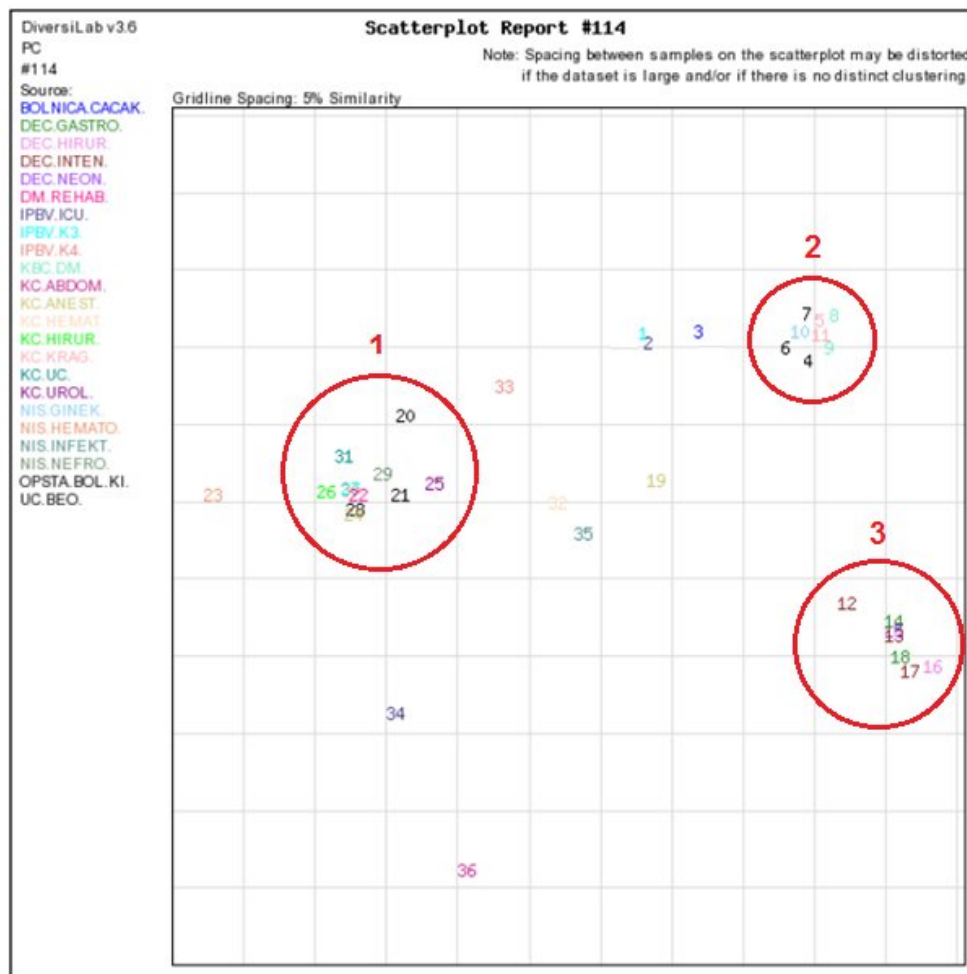
Ispitana je srodnost odabranih multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* korišćenjem repPCR metode pomoću automatizovanog DiversiLab sistema. Na Slici 19 prikazan je dendrogram sa odgovarajućim klasterima, osnovnim podacima o uzorku i prikazom virtuelnih gelova na osnovu kojih je određena srodnost izolata.



Slika 19. Dendrogram odabranih multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae*

*U levom donjem uglu nalazi se skala izražena u procentima. Srodnost iznad 95% označena je crvenom isprekidanom linijom. Pravougaonicima u boji su označeni klasteri, a pored je napisan broj. Prikazana je oznaka uzorka i mesto iz kog potiče uzorak, kao i vrsta materijala iz kog su izolovani multirezistentni izolati. Krajnje desno prikazani su virtuelni gelovi.

Na Slici 20 prikazani su grupisani izolati *Klebsiella pneumoniae* sa visokim stepenom srodnosti. Obeležena grupa 1 predstavlja izolate sa NDM karbapenemazama koji potiču iz različitih zdravstvenih ustanova. Grupa 2 prikazuje izolate sa OXA-48-like i/ili NDM karbapenemazama takođe iz različitih zdravstvenih centara. Izolati sa NDM karbapenemazama koji potiču iz iste zdravstvene ustanove prikazani su u grupi 3.



Slika 20. Grafički prikaz srodnosti odabranih multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* korišćenjem automatizovanog DiversiLab sistema.

*Crveni krugovi označavaju najveći stepen srodnosti među izolatima

6 DISKUSIJA

Gram-negativne crevne bakterije spadaju u najčešće uzročnike bolničkih infekcija. Rezistencija enterobakterija predstavlja rastući problem u svetu. Ovakav trend zahteva povećane mere kontrole daljeg širenja rezistencije. Multirezistentni izolati bakterija predstavljaju rezervoar multiplih genetičkih elemenata koji su odgovorni za nastanak rezistentnih fenotipova. Takvi bakterijski sojevi mogu vertikalnim transferom (sa majke ćelije na ćerke ćelije) da prenose determinante rezistencije i omogućće širenje soja i njegovu povećanu zastupljenost. Takođe, multirezistentni sojevi mogu da postanu donori i da horizontalno prenesu determinante rezistencije na druge sojeve, vrste ili rodove (30). Dodatni problem predstavljaju multirezistentni regioni koji imaju pluripotentni potencijal rezistencije, tako da upotreba jednog antibiotika dovodi do rezistencije na mnoge druge. Racionalna upotreba antibiotika, naročito beta-laktama, kao što su treća generacija cefalosporina i karbapenema, ima za cilj smanjenje selektivnog pritiska kojem su ove bakterije izložene. Proučavanjem različitih mehanizama rezistencije naročito među bakterijama nađenim u prirodi stičemo znanja o novim mogućim mehanizmima. Geni rezistencije nađeni u prirodi mogu da se prenesu na enterobakterije značajne za medicinu, ali i obrnuto, sa humanih patogena geni rezistencije mogu putem otpadnih voda, vodotokova, životinja ili biljaka da dospeju u prirodu. Registrovanjem i praćenjem multirezistentnih sojeva poboljšava se nadzor i omoguććava ciljana primena neophodnih mera za suzbijanje epidemija. Bolja kontrola infekcija adekvatnom higijenom ruku, korišćenjem zaštitnih sredstava naročito prilikom nege pacijenata kolonizovanih ili inficiranih rezistentnim sojevima, značajno doprinosi sprečavanju širenja multirezistentnih sojeva enterobakterija u bolnicama.

U nedostatku novih antibiotskih agenasa koji bi bili razvijeni u bliskoj budućnosti, deluje da se bližimo kraju antibiotske ere. Sa ciljem naglašavanja ozbiljnosti situacije i poređenjem sa klasičnim svetskim pandemijama, epidemija rezistencije Gram-negativnih bakterija je nazvana „Crvena kuga“ (168).

Naše istraživanje je obuhvatilo 300 multirezistentnih izolata iz različitih zdravstvenih centara u jednogodišnjem periodu. Izolati potiču od pacijenata različite starosne strukture, prosečne starosti od 52 godine. Većina pacijenata, nešto više od 60%, je bila smeštena na kliničkim odeljenjima, dok su ostali bili hospitalizovani u jedinicama intenzivne nege. Više od trećine multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* potiče iz urina i oko trećine izolata potiče iz krvi, potom slede uzorci iz donjeg respiratornog trakta, sekreta rana i punktata. *Klebsiella pneumoniae* je identifikovana u više od 80% izolata, a znatno ređe *Escherichia coli*. Multirezistentni sojevi *Klebsiella pneumoniae* predstavljaju značajne uzročnike naročito bolničkih ali i vanbolničkih infekcija kao što su infekcije urinarnog trakta, pneumonija, septikemija, meningitis i infekcije mekih tkiva. Sojevi *Klebsiella pneumoniae* imaju sposobnost akumuliranja plazmida koji nose gene rezistencije za veliki broj antibiotika kao što su penicilini, cefalosporini, karbapenemi, aminoglikozidi i fluorohinoloni (29). Prenos gena rezistencije sa *Klebsiella pneumoniae* na *Escherichia coli* može doprineti širenju multirezistentnih izolata u zajednici uzrokujući pre svega teške urinarne infekcije (169). Sa druge strane, sojevi *Escherichia coli* koji nose gene rezistencije mogu dospeti u crevni trakt ljudi sa životinja ili iz vodene sredine putem hrane, vode ili preko ruku. Multirezistentni izolati *Escherichia coli* kod ljudi mogu da uzrokuju brojna oboljenja, ali i da prenesu determinante rezistencije na druge patogene bakterije, što za posledicu ima razvoj teže bolesti, produženo trajanje bolesti i zbog toga često terapijski neuspeh (5). Smanjenu osetljivost na bar jedan testirani karbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) pokazalo je 179 multirezistentnih izolata. Od izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme više od 90% činili su izolati *Klebsiella pneumoniae*, a ostalo izolati *Escherichia coli*. Dokazana je statistički značajna razlika između izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost na bar jedan karbapenem i izolata osetljivih na karbapeneme u korist *Klebsiella pneumoniae*.

Fenotipski test za dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem je bio pozitivan kod polovine ispitivanih izolata. Fenotipski test za dokazivanje karbapenemaza kod izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem bio je pozitivan kod nešto više od trećine izolata (36,3%). Kod svih izolata osetljivih na karbapeneme fenotipski test za utvrđivanje prisustva karbapenemaza je bio negativan. Utvrđena je statistički značajna razlika među izolatima sa smanjenom osetljivošću na

bar jedan karbapenem i izolata osetljivih na karbapeneme u odnosu na rezultat fenotipskog testa. Kod 179 izolata sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem geni koji kodiraju karbapenemaze (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} , $bla_{OXA-48-like}$) nađeni su kod 79 (44,1%) izolata. Kod izolata osetljivih na karbapeneme nije nađen ni jedan gen koji kodira karbapenemaze. Utvrđena je statistički značajna razlika među izolatima sa smanjenom osetljivošću na bar jedan karbapenem i izolata osetljivih na karbapeneme u odnosu na prisustvo gena koji kodiraju karbapenemaze. Korišćenim fenotipskim testom za dokazivanje karbapenemaza moglo je da se dokaže prisustvo metalo-beta laktamaza klase B, karbapenemaza iz klasa A i da se eliminiše prisustvo AmpC tipa cefalosporinaza. Od 65 izolata sa pozitivnim fenotipskim testom za dokazivanje karbapenemaza, 63 su ukazivala na prisustvo metalo-beta laktamaza, a 2 su ukazivala na prisustvo karbapenemaza iz grupe A. Geni koji kodiraju karbapenemaze su nađeni kod 60 izolata sa pozitivnim fenotipskim testom, dok kod 5 izolata nisu detektovani geni koji kodiraju karbapenemaze. Senzitivnost fenotipskog testa za dokazivanje karbapenemaza klase A i B iznosila je 100,0%, specifičnost 96,6%, a ukupna tačnost testa bila je 97,6%. Visoka senzitivnost od 100% i specifičnost od 98,8% fenotipskog testa za dokazivanje karbapenemaza klase A i B potvrđena je od strane drugih autora (161,170). Kod 58 izolata sa pozitivnim fenotipskim testom na prisustvo metalo-beta-laktamaza utvrđeno je prisustvo bla_{NDM} gena, a kod 2 izolata kod kojih je fenotipski test ukazivao na prisustvo klase A karbapenemaza, detektovan je bla_{KPC} gen. Pozitivan fenotipski test kod 5 izolata bez detekovanih gena koji kodiraju karbapenemaze ukazivao je na prisustvo metalo-beta laktamaza. Lažno pozitivni rezultati u testu sinergizma sa EDTA su opisani kod izolata *Klebsiella pneumoniae* koji proizvode KPC enzime, OXA-48 enzime, ali i kod izolata sa CTX-M-15 beta-laktamazama sa gubitkom porina (171). Lažno pozitivni rezultati u testu sinergizma sa EDTA opisani su u malom procentu i kod drugih Gram-negativnih bakterija (172,173). S druge strane, iako su testirani najčešći geni koji kodiraju metalo-beta-laktamaze (bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP}) prisustvo ostalih gena iz klase B se ne može isključiti. Među izolatima sa negativnim fenotipskim testom kod 19 izolata su dokazani geni koji kodiraju karbapenemaze. Kod 11 izolata utvrđeno je prisustvo $bla_{OXA-48-like}$ gena. Ne postoji specifičan inhibitor OXA-48 enzima koji bi mogao da se uvrsti u fenotipske testove sinergizma (174). Kod 8 izolata utvrđeno je prisustvo 2 gena koji kodiraju karbapenemaze bla_{NDM} i $bla_{OXA-48-like}$. Fenotipskim testom sinergizma je dokazivanje prisustva karbapenemaza kod izolata koji

poseduju 2 vrste karbapenemaza iz različitih klasa manje pouzdano, budući da inhibitorno dejstvo jednog inhibitora može bude poništeno prisustvom drugog enzima (161,175).

Od 79 izolata sa dokazanim karbapenemazama bilo je 68 izolata *Klebsiella pneumoniae* i 11 izolata *Escherichia coli*. Kod izolata *Klebsiella pneumoniae* utvrđeno je prisustvo KPC, NDM i OXA-48-like enzima kao i kombinacija NDM i OXA-48-like enzima. Kod izolata *Escherichia coli* nađena je samo NDM karbapenemaza. Kod svih izolata NDM karbapenemaza je bila najzastupljenija, dominantna u svih 8 gradova u kojima su nađeni izolati koji produkuju karbapenemaze. Prvi objavljeni radovi o infekcijama izazvanim izolatima koji produkuju NDM karbapenemaze odnosili su se na osobe koje su zdravstvenu negu primali u Indiji, iako precizno geografsko poreklo i tačno vreme pojave bla_{NDM} gena nisu poznati (113). Enzim NDM je prvi put izolovan u januaru 2008. godine kod muškarca indijskog porekla koji je živeo u Švedskoj i tokom više godina putovao u Indiju, gde je bio hospitalizovan. Dan nakon prijema u bolnicu u Švedskoj izolovan je multirezistentan soj *Klebsiella pneumoniae* rezistentan na karbapeneme. U martu 2008. godine iz uzorka stolice istog pacijenta izolovana je *Escherichia coli* rezistentna na karbapeneme. Budući da PCR-om nisu nađeni do tada poznati geni, kloniranjem i sekvenciranjem utvrđeno je da se radi o novoj metalo-beta-laktamazi nazvanoj NDM-1 (107,110). Pojava istog, novoopisanog gena rezistencije u dve različite vrste bakterija ukazala je mogućnost njegovog prenosa, što je i eksperimentalno potvrđeno nalazom bla_{NDM-1} gena na plazmidima veličine 180 i 140 kb (110). Naredne godine NDM-1 enzim je nađen kod 29 pacijenata u Ujedinjenom Kraljevstvu. Iste godine gen bla_{NDM} je identifikovan kod 143 pacijenta sa brojnih mesta na indijskom potkontinentu (176). Indija i Pakistan se smatraju endemskim područjem za bakterije koje produkuju NDM. Prenos i širenje NDM karbapenemaza po celom svetu se desio zahvaljujući putovanjima, “medicinskom turizmu” i sposobnosti genetičkih elemenata da se prenose među bakterijama (177). Enzim NDM-1 je nađen kod mnogih vrsta bakterija, ali najčešće kod *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, prikupljenih tokom 2008. i 2009. godine u Velikoj Britaniji, Indiji, Pakistanu i Bangladešu (178). Širenje NDM-1 i drugih varijanti enzima se beleži u mnogim zemljama kao što su Alžir (179), Austrija (180), Australija (181), Belgija (182), Češka (183), Egipat (184), Francuska (185), Holandija (186), Honduras (187), Hong Kong (188), Irska (189), Italija (190), Iran (191), Island (192), Izrael (193), Japan (194), Južna Koreja

(195), Kanada (196), Kina (197), Kenija (198), Kolumbija (199), Kuvajt (200), Nemačka (201), Nepal (202), Norveška (203), Novi Zeland (204), Malezija (205), Maroko (206), Mauricijus (207), Meksiko (208), Oman (209), Rusija (210), Taivan (211), Tunis (212), Turska (213), Singapur (214), Sjedinjene Američke Države (215), Šri Lanka (216), Švajcarska (217), Švedska (107). Generalno u Evropi, zastupljenost NDM enzima nije dosegla razmere zastupljenosti KPC karbapenemaza po podacima iz 2013. godine (83). Smatra se da područje Balkana i Bliski Istok (Oman i Irak) predstavljaju dodatni, sekundarni izvor bakterija koje produkuju NDM (178,218). Nažalost, za većinu balkanskih zemalja ne postoje podaci koji se tiču zastupljenosti pojedinih karbapenemaza ili nisu sveobuhvatni (83). U Srbiji NDM je prvi put detektovan u izolatu *Pseudomonas aeruginosa* 2010. godine (219). Kod izolata *Klebsiella pneumoniae* NDM karbapenemaza je prvi put identifikovana 2011. godine iz urina sedmomesečnog dečaka, koji nije imao kliničke znake urinarne infekcije (153). Od balkanskih zemalja, u Bugarskoj je zabeležena bolnička epidemija uzrokovana sojem *Escherichia coli* koji produkuje NDM (220). Ne postoje dostupni podaci za Albaniju, Bosnu i Hercegovinu i Bivšu jugoslovensku republiku Makedoniju. Izolati enterobakterija koji produkuju NDM kod dva pacijenata, jednog prvobitno hospitalizovanog u Crnoj Gori, drugog na Kosovu, nađeni su u Belgiji (182). Pored kliničkih izolata, analizirani su i uzorci iz životne sredine, sa ciljem utvrđivanja endemskog prisustva NDM karbapenemaza u našoj zemlji koja pripada balkanskom području. Grupa autora iz Srbije nije našla *bla*_{NDM} gen u uzorcima površinskih voda sa područja Beograda (221). Od ostalih zemalja u okruženju, NDM karbapenemaza je prvi put izolovana u Hrvatskoj 2009. godine iz izolata *Klebsiella pneumoniae* (222), ali je VIM najzastupljenija karbapenemaza među enterobakterijama na tom području (223). Enzim NDM se i dalje sporadično izoluje u Hrvatskoj, najčešće među izolatima *Klebsiella pneumoniae*, ali i među drugim enterobakterijama, a javlja se i zajedno sa VIM karbapenemazama (224). Karbapenemaze NDM i OXA-48 nađene su i u Rumuniji kod enterobakterija rezistentnih na karbapeneme (225).

Enzimi OXA-48-like su drugi po zastupljenosti u našem istraživanju, sa distribucijom po svim gradovima osim u Čačku. Prava prevalencija OXA-48 enzima je nedovoljno poznata, budući da enzimi poseduju varijabilnu aktivnost u odnosu na karbapeneme i teško se detektuju fenotipskim metodama (120). Enzimi OXA-48 su prvi put detektovani u Turskoj u izolatu *Klebsiella pneumoniae*, a ubrzo su usledile bolničke epidemije po celoj zemlji (226). Turska,

zemlje Bliskog Istoka i severnoafričke zemlje se smatraju najvećim rezervoarom OXA-48 gena (120). Pojava OXA-48 enzima kod enterobakterija beleži se u Libanu (227), Omanu (228), Saudijskoj Arabiji i Kuvajtu (229). Od severnoafričkih zemalja najviše podataka vezano za produkciji OXA-48 enzima ima iz Tunisa (230), Maroka (231), Egipta i Libije (229). Među evropskim zemljama OXA-48 karbapenemaze su prvo zabeležene u Engleskoj i Francuskoj (232,233). Sporadično se javljaju u Belgiji (234), Engleskoj (235), Holandiji (236), Španiji (237), Nemačkoj (238), Italiji (239) i Švajcarskoj (154,240). Od evropskih zemalja OXA-48 karbapenemaze su među najčešće izolovanim u Belgiji, Francuskoj i Malti (83). Od zemalja u okruženju enzim OXA-48 je prva identifikovana karbapenemaza u Sloveniji iz izolata *Escherichia coli* od pacijenta koji je poreklom iz Libije (241). U Hrvatskoj OXA-48 karbapenemaze nisu bile prisutne do 2014. godine, od tada se javljaju sporadično, bez dokazane povezanosti sa endemskim područjima (224). U Mađarskoj su 2012. godine nađena 2 izolata *Klebsiella pneumoniae* sa varijantom OXA-48 enzima, OXA-162, što predstavlja prvi izveštaj OXA-48-like enzima u toj zemlji (242).

Istovremena produkcija OXA-48 i NDM kod *Klebsiella pneumoniae* se sve češće javlja. Prema publikovanim podacima enzimi OXA-48 i NDM su prvi put istovremeno detekovani u Maroku u izolatu *Klebsiella pneumoniae* iz urina (243). U Tunisu je izolat *Klebsiella pneumoniae* sa istovremenom produkcijom OXA-48 i NDM dobijen iz sternalnog puktata (212). U Turskoj je 2013. godine prvi put izolovan soj *Klebsiella pneumoniae* sa koprodukcijom NDM i OXA-48 karbapenemazama iz urina sedamdesetpetogodišnje pacijentkinje (244). U Tunisu i u Turskoj produkcija OXA-48 karbapenemaza je endemskog karaktera (212,244). Zabeležena je istovremena produkcija NDM i OXA-48-like karbapenemaza u Maleziji kod izolata *Klebsiella pneumoniae* iz urina pacijenta prethodno hospitalizovanog u Indiji (245). U Indiji je detektovana koprodukcija NDM i OXA-48 enzima kod izolata *Escherichia coli* iz urina (246). U Singapuru su opisana 2 izolata *Klebsiella pneumoniae* sa istovremenom produkcijom OXA-48-like (OXA-181) i NDM enzima. Geni *bla*_{OXA-181} su poticali iz različitih genetičkih okruženja (247). U Evropi koprodukcija NDM i OXA-48 zabeležena je u Bernu u Švajcarskoj kod pacijenta prethodno hospitalizovanog u Beogradu na jedinici intenzivne nege u Kliničkom centru Srbije (154). U našem istraživanju bilo je 8 izolata *Klebsiella pneumoniae* kod kojih je dokazano istovremeno prisustvo NDM i OXA-48 enzima, 7 izolata iz Beograda i jedan izolat iz Sombora.

Enzimi VIM tipa su se pojavili u početkom 2000-tih u južnom delu Evrope, a potom se proširili i na severnije evropske zemlje (Nemačka, Francuska, skandinavske zemlje) i Sjedinjene Američke Države, najčešće preko kolonizovanih pacijenata (248). Učestalost izolacije *Klebsiella pneumoniae* koja produkuje VIM metalo-beta-laktamaze je ostala niska u severnoevropskim zemljama i Sjedinjenim Američkim Državama iako su se javljale bolničke epidemije (249). Sporadični slučajevi zabeleženi su u Tunisu (250), Iranu (251), Južnoj Koreji (252), Venecueli (253). Do skoro, *Klebsiella pneumoniae* koja produkuje VIM metalo-enzime je često izolovana na području Mediterana, dok je u Grčkoj dosegla epidemijske razmere (249,254). Od zemalja u okruženju VIM karbapenemaze se najčešće izoluju u Mađarskoj i Hrvatskoj (223,255).

Metallo-beta-laktamaze IMP su se pojavile 90-tih godina u izolatima *Klebsiella pneumoniae* u Japanu, Tajvanu i Singapuru (69). Klinički izolati koji produkuju IMP enzime se i dalje javljaju u Japanu (256). Opisane su bolničke epidemije u Kini (257) i Australiji (258). U svetu se IMP enzimi javljaju sporadično. Opisani su pojedinačni slučajevi u Turskoj (259), Libanu (260), Sjedinjenim Američkim Državama (261), Brazilu (262), Maleziji (263) i Tajlandu (264). U Evropi se javljaju retko, nađeni su u Španiji (265). Iako je opisana bolnička epidemija izazvana sojem *Proteus mirabilis* koji je produkovao metalo-beta-laktamaze VIM i IMP u hirurškoj intenzivnoj jedinici Kliničkog centra Srbije (266), u našem istraživanju ni jedan od testiranih izolata nije posedovao bla_{VIM} ili bla_{IMP} .

Prva *Klebsiella pneumoniae* koja je produkovala KPC karbapenemazu identifikovana je krajem 90-tih godina u severoistočnom delu Sjedinjenih Američkih država i od tada se beleži njeno širenje (80). Enzim KPC je najčešće detektovana karbapenemaza u Evropi, naročito u Italiji i Grčkoj (83). U određenim delovima sveta bakterije koje produkuju KPC se smatraju endemskim, uključujući severoistočni deo SAD, Argentinu, Brazil, Kolumbiju, Puerto Riko, istočni deo Kine, Izrael, Italiju, Poljsku i Grčku (97). U Grčkoj prisustvo KPC i VIM karbapenemaza dostiže epidemijske razmere (160). Od zemalja u okruženju KPC karbapenemaze nađene su u Mađarskoj (267) i u Hrvatskoj (223). Kod izolata *Klebsiella pneumoniae* grupa autora u Bugarskoj izolovala je VIM i KPC (268). Karbapenemaze KPC nađene su samo kod 2 izolata *Klebsiella pneumoniae* u Sremskoj Kamenici, iz urina i sekreta rane. Nalaz KPC karbapenemaza u ovom istraživanju predstavlja prvu detekciju enzima klase A u Srbiji.

Kod više od 85% izolata sa dokazanim genima koji produkuju karbapenemaze dokazano je istovremeno prisustvo i *bla*_{CTX-M} gena koji kodira beta-laktamaze proširenog spektra. Kod svih izolata koji pokazuju smanjenu osetljivost na karbapeneme, a ne produkuju karbapenemaze, dokazano je prisustvo *bla*_{CTX-M} gena. Rezistencija na karbapeneme, pored prisustva karbapenemaza, može nastati usled gubitka porina u kombinaciji sa produkcijom beta-laktamaza proširenog spektra ili AmpC beta-laktamaza. Naročito prisustvo CTX-M enzima u kombinaciji sa gubitkom porina može uzrokovati rezistenciju na ertapenem (52). Druga grupa autora dokazala je da gubitak porina OmpK35/36 u kombinaciji sa genom *bla*_{CTX-M-15} ili *bla*_{DHA-1-ampR} (gen koji kodira vrstu AmpC cefalosporinaza) kod izolata *Klebsiella pneumoniae* može uzrokovati rezistenciju na sva četiri karbapenema (meropenem, imipenem, ertapenem i doripenem) (269). Ertapenem se smatra indikatorom visoke senzitivnosti za dokazivanje produkcije karbapenemaza kod bakterija (270). Međutim, ertapenem pokazuje nisku specifičnost za detekciju karbapenemaza u odnosu na meropenem i imipenem (271). CTX-M enzim najverovatnije doprinosi smanjenoj osetljivosti na ertapenem vezivanjem visokim afinitetom za molekul leka. Ertapenem se pokazao najmanje efikasnim za izolate sa gubitkom porina, cefalosporinazama i karbapenemazama (269). U našem istraživanju *bla*_{CTX-M} se često detektuje uz gene koji kodiraju karbapenemaze. Određivanje prisustva drugih gena koji kodiraju beta-laktamaze nije bilo planirano istraživanjem. Gram-negativni bolnički izolati često istovremeno poseduju više beta-laktamaza. U istraživanju sprovedenom u Sjedinjenim Američkim Državama u jednom bolničkom izolatu *Klebsiella pneumoniae* nađeno je 8 različitih beta-laktamaza (272). Novi geni koji kodiraju beta-laktamaze nastavljaju da se dodaju na plazmide ili genske kasete kod bakterija koje već poseduju *bla* gene. Sa velikim brojem različitih nukleotidnih sekvenci u okruženju verovatnoća funkcionalnih mutacija raste, naročito usled selektivnog pritiska (46).

U vreme uzorkovanja pacijenti su bili smešteni na kliničkim odeljenjima ili u jedinicama intenzivne nege. U našem istraživanju oko 50% izolata koji produkuju karbapenemaze potiče iz jedinica intenzivne nege, a nešto manje od 50% sa kliničkih odeljenja. Nije utvrđena statistički značajna razlika između detekcije gena koji kodiraju karbapenemaze i odeljenja na kom su pacijenti bili smešteni u vreme uzorkovanja. Nedostaje podatak o prethodnom boravku pacijenata u jedinicama intenzivne nege, što predstavlja nedostatak naše studije. S druge strane, zbog nedovoljnog epidemiološkog nadzora u našim zdravstvenim ustanovama, vrlo verovatno dolazi

do širenja rezistentnih sojeva po kliničkim odeljenjima. Prema literaturnim podacima bolničke infekcije uzrokovane sojevima koji produkuju karbapenemaze su u početku bile su karakteristične za jedinice intenzivne nege (160,273–276). Skoriji nalazi ukazuju na širenje takvih sojeva po različitim kliničkim odeljenjima i različitim zdravstvenim ustanovama (160). Grupa autora iz Izraela dokazala je da je boravak u jedinicama intenzivne nege nezavistan faktor za kolonizaciju ili infekciju sojem *Klebsiella pneumoniae* koji produkuje karbapenemaze, pored lošeg funkcionalnog statusa pacijenta i prethodne primene antibiotske terapije (275). Pored navedenog, u ostale faktore rizike spada i višestruka primena medicinskih pomagala i katetera, prethodna hirurška intervencija i prisustvo rana (277,278) čime delimično može da se objasni visoka zastupljenost infekcija izazvanih bakterijama koje produkuju karbapenemaze i na kliničkim odeljenjima.

Izolati koji produkuju karbapenemaze najčešće potiču iz urina u više od polovine uzoraka, potom iz uzoraka donjeg respiratornog trakta, iz krvi i sekreta rana. U studiji sprovedenoj u Španiji, tokom dvogodišnjeg perioda, *Klebsiella pneumoniae* rezistentna na karbapeneme izolavana je iz 35,7% urina, 21,4% krvi, 14,3% hirurških rana i 14,3% respiratornih uzoraka (279). U Italiji su tokom jedno i po godišnjeg perioda prikupljena 23 izolata enterobakterija koje produkuju karbapenemaze, u najvećem procentu iz urina (14/23), respiratornih uzoraka (3/23), krvi (2/24) i ostalih uzoraka (280). U studiji sprovedenoj na Tajvanu tokom dvogodišnjeg ispitivanja izolati *Escherichia coli* koji su produkovali karbapenemaze, najčešće su izolovani iz urina (25,0%), krvi (12,5%), žuči (6,3%) i ostalih uzoraka (abdominalni i pleuralni sadržaji i punktati-56,3%). *Klebsiella pneumoniae* koja produkuje karbapenemaze izolovana je najčešće iz urina (21,7%), krvi (18,3%), žuči (18,3%), sputuma (16,7%) i ostalih uzoraka (abdominalni i pleuralni sadržaji i punktati-25,0%) (281). U infekcije uzrokovane enterobakterijama koje produkuju karbapenemaze najčešće spadaju bakterijemije, pneumonija i urinarne infekcije kako se navodi u meta analizi sprovedenoj 2014. godine u koju je bilo uključeno 20 studija (282).

Disk difuzionom metodom, najčešće korišćenom metodom za određivanje osetljivosti bakterijskih izolata na antimikrobne lekove u rutinskom mikrobiološkom radu, izolati koji produkuju karbapenemaze pokazivali su smanjenu osetljivost na sve testirane beta-laktame i gentamicin. Visok procenat rezistencije evidentiran je za trimetoprim/sulfametoksazol (93,7%) i

ciprofloksacin (92,4%). Najefikasnijim se pokazao amikacin sa 62% neosetljivih izolata. Određivanjem osetljivosti automatizovanim Vitek 2 sistemom koji se bazira na dilucionoj metodi, nalaz osetljivosti ispitivanih izolata takođe ukazuje na neefikasnost svih beta-laktamskih antibiotika i tobramicina. Visok procenat rezistencije izolati su pokazali u odnosu na gentamicin (96,2%), ciprofloksacin i levofloksacin (92,4%), trimetoprim/sulfametoksazol (91,1%). Najefikasniji antibiotski lekovi za izolate koji produkuju karbapenemaze sa procentima rezistencije su amikacin (43,0%), tigeciklin (17,5%), fosfomicin (7,6%) i kolistin (5,1%).

Posmatrano u odnosu na bakterijsku vrstu, ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom svih izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze ukazuje na neefikasnost svih beta-laktamskih antibiotika uključujući karbapeneme i gentamicin primenjen u standardnom doznom režimu. Smanjena osetljivost registrovana je na trimetoprim/sulfametoksazol i ciprofloksacin, a najefikasniji lek je bio amikacin (67,6%). Korišćenjem automatizovanog Vitek 2 sistema za ispitivanje osetljivosti izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju karbapenemaze takođe je evidentirana smanjena osetljivost na sve beta-laktame i tobramicin. Visok procenat neosetljivosti izolati su pokazali u odnosu na gentamicin, ciprofloksacin, levofloksacin i trimetoprim/sulfametoksazol. Najdelotvorniji antibiotski lekovi sa navedenim procentima rezistencije bili su amikacin (44,1%), tigeciklin (20,0%), fosfomicin (11,1%) i kolisitin (5,9%). Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom svih izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze ukazuje na neefikasnost svih beta-laktamskih antibiotika uključujući karbapeneme i gentamicin. Najniži procenat rezitencije zabeležen je za trimetoprim/sulfametoksazol (63,6%), ciprofloksacin (54,5%), a najdelotvorniji je bio amikacin (27,3%). Za navedene lekove kod izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze registrovan je niži procenat rezistencije u odnosu na izolate *Klebsiella pneumoniae* sa dokazanim karbapenemazama. Primenom dilucione metode takođe je ustanovljena neosetljivost izolata *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze na sve beta-laktamske antibiotike, ali i na gentamicin i tobramicin. Visok nivo rezistencije je evidentiran za trimetoprim/sulfametoksazol, nešto niži za fluorohinolone (54,5%), ciprofloksacin i levofloksacin, i za amikacin (36,4%). Najdelotvorniji antimikrobni lekovi su bili tigeciklin, fosfomicin i kolistin. Na fosfomicin i kolistin ni jedan izolat nije pokazao smanjenu osetljivost ili neosetljivost. Iako profili rezistencije među enterobakterijama koje produkuju karbapenemaze

mogu da budu različiti, najveći broj izolata je rezistentan na većinu beta-laktama, fluorohinolone i trimetoprim/sulfametoksazol, te je terapijski izbor uglavnom ograničen na primenu kolistina, aminoglikozida, fosfomicin i tigeciklin (82,229,283). Tigeciklin u kombinaciji sa kolistinom, karbapenem u kombinaciji sa kolistinom, fosfomicin sa karbapenemom, fosfomicin sa aminoglikozidom i karbapenem u kombinaciji sa aminoglikozidom predstavljaju najčešće kombinacije antibiotskih terapijskih režima i pokazuju manji mortalitet u odnosu na primenu drugih kombinacija antibiotika (282). Pokazano je da kombinacija karbapenema sa nekim drugim lekom može da dovede do boljeg preživljavanja (274,284,285). Postoje dokazi o efikasnosti trojne antibiotske terapije: kolistin-tigeciklin-meropenem, najverovatnije zbog potencijalnog sinergističkog dejstva meropenema i kolistina (284). Odluka da li će se primeniti kombinovana antibiotska terapija ili monoterapija zavisi od vrste infekcije, uzročnika, profila rezistencije ili komorbiditeta pacijenta. U kliničkoj praksi, kombinacija antibiotika se često daje pacijentima sa teškim infekcijama da bi se empirijski proširio spektar delovanja ili zbog polimikrobnih infekcija. Postoje dokazi iz kliničkih i *in vitro* studija da kombinovana antibiotska terapija može da prevenira pojavu rezistentnih sojeva tokom terapije (286,287). Sinergizam predstavlja potencijalni benefit kada se primenjuje kombinovana terapija. Međutim, *in vitro* sinergizam određenih antibiotika ne mora da se pokaže i u kliničkoj efikasnosti leka (282). Podaci dobijeni *in vitro* testiranjem osetljivosti enterobakterija koji produkuju karbapenemaze pokazuju da su kolistin, tigeciklin i fosfomicin najefikasniji antimikrobni lekovi, naročito za sojeve koji produkuju KPC enzime i metalo-beta-laktamaze. Delotvornost leka se razlikuje u zavisnosti od proširenosti rezistentnih izolata u određenom okruženju. U mnogim studijama je pokazano smanjenje aktivnosti navedenih lekova u odnosu na izolate koji produkuju karbapenemaze (267,288–290). Među testiranim izolatima u našoj studiji postoji mali broj izolata *Klebsiella pneumoniae* koji su neosetljivi na kolistin, tigeciklin ili fosfomicin. Među izolatima *Escherichia coli* koji produkuju karbapenemaze nije evidentirana rezistencija na navedene antimikrobne lekove.

Poređenjem minimalnih inhibitornih koncentracija utvrđena je statistički značajna razlika za meropenem, imipenem, ertapenem, amikacin i gentamicin izolata koji produkuju karbapenemaze i izolata koji ne produkuju karbapenemaze. Za ostale testirane antimikrobne lekove (ampicilin, piperacilin, piperacillin/tazobaktam, ceftriakson, ceftazidim, cefepim,

tobramicin, ciprofloksacin, levofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol, tigeciklin, fosfomicin, kolistin) nije utvrđena značajna razlika što govori u prilog sličnog profila rezistencije kod ispitivanih multirezistentnih izolata nezavisno od produkcije karbapenemaza. Sticanjem gena koji kodiraju karbapenemaze, eliminišu se rezervni antibiotici, karbapenemi, značajni u lečenju infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima.

Određivanjem osetljivosti na meropenem upotrebom Vitek 2 sistema karbapenemaze su dokazane kod 94,0% izolata sa smanjenom osetljivošću na lek. Kada se osetljivost na meropenem određena Vitek 2 sistemom koristila za skrining na produkciju karbapenemaza senzitivnost testa je bila 100%, specifičnost 90,2%, a ukupna tačnost 96,1%. Određivanjem osetljivosti na imipenem upotrebom Vitek 2 sistema karbapenemaze su dokazane kod 95,2% izolata sa smanjenom osetljivošću na lek. Kada se osetljivost na imipenem određena Vitek 2 sistemom koristila za skrining na produkciju karbapenemaza senzitivnost testa je bila 100%, specifičnost 92,2%, a ukupna tačnost 96,9%. U našoj studiji interpretacija rezultata ispitivanja osetljivosti korišćenjem Vitek 2 sistema vršena je prema CLSI standardu. U sličnoj studiji u kojoj se interpretacija takođe zasnivala na CLSI standardu, senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost za izolate sa smanjenom osetljivošću na imipenem i meropenem su iznosile 98%, 94%, 95% i 98% (291). U studiji koreanskih autora u detekciji karbapenemaza senzitivnost za meropenem iznosila je 95,3%, za imipenem 93,0%, a za ertapenem 100,0%, dok je specifičnost bila 89,9%, korišćenjem Vitek AST-N202 kartice (292). Iako se smatra da ertapenem najtačnije detektuje prisustvo karbapenemaza, naročito KPC enzima različitim metodama, uključujući i Vitek 2 sistem (293), u onim područjima u kojima je visoka zastupljenost drugih mehanizama rezistencije na karbapeneme, autori preporučuju korišćenje imipenema i meropenema za utvrđivanje prisustva karbapenemaza (291). U našem istraživanju karbapenemaze su dokazane kod 62,9% izolata smanjenom osetljivošću na ertapenem. Senzitivnost, specifičnost i ukupna tačnost nisu mogle biti izračunate zbog malog broja testiranih izolata koji su bili osetljivi na ertapenem. Grupa autora pokazala je da su minimalne inhibitorne koncentracije za ertapenem značajno više korišćenjem Vitek 2 sistema u odnosu na one određene E testom i agar dilucionom metodom. U navedenom istraživanju nisu nađeni izolati koji produkuju karbapenemaze, iako su svi bili smanjene osetljivosti na ertapenem kada su minimalne

inhibitorne koncentracije određivane Vitek 2 sistemom, dok je 42% izolata bilo osetljivo prema interpretaciji E testa i agar dilucione metode (294). Takođe, uspešnost detekcije sojeva koji proizvode karbapenemaze zavisi i od vrste prisutnog enzima, budući da karbapenemaze različitih klasa mogu različito da deluju na pojedine karbapeneme. S toga bi, u cilju pouzdanije detekcije karbapenemaza, trebalo testirati sve karbapeneme (270,292). Smatra se da je upotreba Vitek 2 sistema u detekciji karbapenemaza korisna, ali da zavisi i od vrste korišćenih antibiotskih kartica (270).

Korišćenjem disk difuzione metode za skrining na prisustvo karbapenemaza, karbapenemaze su dokazane kod 74,5% izolata sa smanjenom osetljivošću na meropenem. Kad je korišćen imipenem, kod 89,8% izolata sa smanjenom osetljivošću dokazane su karbapenemaze. Senzitivnost oba testa je bila 100%, specifičnost 87,8% za meropenem, a 96,4% za imipenem, a ukupna tačnost 91,0% i 97,1%. Korišćenjem disk difuzione metode za određivanje osetljivosti na ertapenem, karbapenemaze su dokazane kod 40,3% izolata sa smanjenom osetljivošću. Osetljivost na ertapenem određena disk difuzionom metodom pokazala je senzitivnost od 100%, ali nisku specifičnost (47,0%), a ukupna tačnost je iznosila 61,0%. Pojedini autori smatraju da disk difuziona metoda može da se koristi za skrining na prisustvo karbapenemaza i da je naročito korisna za sojeve *Klebsiella pneumoniae* koji proizvode KPC i VIM karbapenemaze. U pomenutom istraživanju, na osnovu graničnih vrednosti korišćenjem disk difuzione metode otkriveno je više izolata koji proizvode karbapenemaze nego korišćenjem minimalnih inhibitornih koncentracija (270).

Određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija gradijent testom za skrining na prisustvo karbapenemaza, kod 89,5% izolata rezistentnih na meropenema je dokazano prisustvo karbapenemaza kada je korišćen CLSI standard, a kada je korišćen EUCAST standard, karbapenemaze su dokazane kod 92,9% rezistentnih izolata. Prilikom korišćenja imipenema, karbapenemaze su dokazane kod 94,9% izolata rezistentnih na imipenem kada je interpretacija vršena po CLSI standardu. Kada je interpretacija osetljivosti izvršena po EUCAST standardu, karbapenemaze su dokazane kod 97,7% izolata rezistentnih na imipenem. Slaganje interpretacija po američkom i evropskom standardu u našem istraživanju iznosilo je 78,9% i za imipenem i meropenem. Interpretacija minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem i imipenem po evropskom standardu pokazala je veću specifičnost u odnosu na američki standard. Razlike u

odnosu na korišćeni standard prilikom korišćenja disk difuzione metode, E testa ili Vitek 2 sistema za skrining na karbapenemaze su ranije opisane u literaturi (270). U kanadskoj studiji, određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija za meropenem produkcija karbapenemaza (NDM, KPC ili OXA-48-like) je dokazana kod 86% izolata (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* i *Enterobacter spp.*) interpretacijom po CLSI standardu, a kod 98,4% izolata korišćenjem EUCAST standarda (295). Za uspešnost rezultata važan je i kvalitet korišćenih podloga, diskova antibiotika i gradijent testova.

Među multirezistentnim izolatima *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* postoje vrlo uspešni klonovi, kao što su *Klebsiella pneumoniae* ST258 i *Escherichia coli* ST131, koji se šire najčešće zbog povećanog međunarodnog transporta, „medicinskog turizma“ i pacijenata koji se nakon lečenja u inostranstvu vraćaju u svoju domovinu (6). Sposobnost identifikovanja ovakvih epidemijskih klonova je od izuzetnog značaja zbog razumevanja njihove epidemiologije i mogućnosti obaveštavanja zdravstvenih ustanova o pojavi epidemijskih sojeva. Ukazala se potreba za pouzdanom metodom za tipizaciju koja bi mogla da identifikuje epidemijske klonove i koja bi mogla da se koristi u različitim centrima, sa međunarodno dostupnom bazom za poređenje (296). Metode koje se najčešće koriste u te svrhe su gel elektroforeza u pulsnom polju (*eng. pulsed-field electrophoresis-PFGE*) i tipizacija višestrukim sekvencama (*eng. multilocus sequence typing-MLST*). DiversiLab je sistem za bakterijsku tipizaciji koji se bazira na repPCR metodi, rezultati su dostupni za jedan dan i dovoljno je jednostavan za korišćenje da bi mogao da se uvede u rutinski laboratorijski rad (297). U našem istraživanju slučajnim odabirom analizirano je 36 multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae*. Na dendrogramu se izdvajaju pojedini klasteri koji obuhvataju izolate sa velikim stepenom srodnosti. Klonalno širenje je evidentno među izolatima koji produkuju NDM enzime ne samo u okviru iste zdravstvene institucije, nego i među različitim zdravstvenim centrima. Klonalno širenje je zabeleženo i za izolate sa OXA-48-like enzimom, sa ili bez NDM metalo-beta-laktamaze, a izolati sa KPC beta-laktamazama se jasno razlikuju od drugih testiranih izolata. Na žalost, iz tehničkih razloga nije postojala mogućnost poređenja naših podataka sa međunarodnom bazom. Za detaljnije podatke o srodnosti cirkulišućih klonova neophodno je uraditi MLST ili neku drugu metodu za tipizaciju.

Preporuke za ispitivanje osetljivosti na karbapeneme u mikrobiološkim laboratorijama u Srbiji zasnovane na podacima iz našeg istraživanja su:

- U cilju pouzdane detekcije prisustva karbapenemaza treba testirati sve karbapeneme, a svakako imipenem i meropenem, nekom od metoda ispitivanja osetljivosti.
- Ertapenem se među karbapenemima smatra pojedinačnim indikatorom visoke senzitivnosti za dokazivanje produkcije karbapenemaza, ali niske specifičnosti, i njegovo korišćenje u detekciji karbapenemaza se ne preporučuje u područjima sa visokim procentom drugih mehanizama rezistencije na karbapeneme. Kako je našim istraživanjem utvrđeno prisustvo CTX-M beta-laktamaza kod velikog broja izolata rezistentnih na bar jedan karbapenem kod kojih nije dokazano prisustvo karbapenemaza, ertapenem ne bi trebalo koristiti za skrining na prisustvo karbapenemaza bez obzira na metod ispitivanja osetljivosti.
- Nakon detekcije smanjene osetljivosti na karbapeneme, preporučuje se korišćenje fenotipskih testova za detekciju karbapenemaza. U relativno jeftine, jednostavne i dostupne testove spadaju kombinovani disk test i dvostrukti test sinergizma sa odgovarajućim inhibitorima (*“in house”* i komercijalni). Negativna strana navedenih testova je nemogućnost detekcije OXA-48 karbapenemaza i istovremenog prisustva dva enzima iz različitih klasa, prisutnih na našem području. Biohemijski testovi za dokazivanje karbapenemaza su preporučeni od strane EUCAST standarda. Kako nisu bili dostupni tokom našeg istraživanja, njihova evaluacija za izolate u našoj zemlji tek treba da usledi. Komercijalni Carba NP testovi su se pojavili na našem tržištu pre nekoliko meseci, a za znatno jeftinije *“in house”* testove još uvek nisu dostupni svi potrebni reagensi.
- Krajnju potvrdu prisustva karbapenemaza treba izvršiti molekularnim metodama u referentnoj ustanovi.

Treba ispitati osetljivost svih izolata sa dokazanim karbapenemazama na antibiotike koji se empirijski koriste za lečenje kao što su kolistin, tigeciklin i fosfomicin zbog prisustva rezistencije

među testiranim izolatima. Detekcija karbapenemaza kod enterobakterija je važna ne samo zbog ordiniranja adekvatne terapije, nego i zbog sprečavanja širenja takvih sojeva unutar zdravstvene ustanove, između zdravstvenih ustanova, pa i izvan granica naše zemlje, odnosno boljeg epidemiološkog nadzora i sprovođenja adekvatne kontrole infekcija.

7 ZAKLJUČCI

1. Multirezistentni izolati *Klebsiella pneumoniae* rezistentni na karbapeneme iz klinički značajnih uzoraka su statistički značajno češći od izolata *Escherichia coli*.
2. Kod izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost prema bar jednom karbapenemu, fenotipski test za dokazivanje karbapenemaza klase A i B bio je pozitivan kod 65/179 (36,3%) izolata.
3. Kod izolata koji su pokazali smanjenu osetljivost prema bar jednom karbapenemu geni koji kodiraju karbapenemaze nađeni su kod 79/179 (44,1%) izolata.
4. Kod svih izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme bez produkcije karbapenemaza dokazano je prisustvo CTX-M beta-laktamaza, koje uz promene u proteinima spoljašnje membrane mogu biti odgovorne za smanjenu osetljivost na karbapeneme.
5. Među genima koji kodiraju karbapenemaze *bla_{NDM}* je nađen kod 58/79 (73,4%) izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*. Kod 11/79 (13,9%) izolata *Klebsiella pneumoniae* detekovani su *bla_{OXA-48-like}* geni, a kod 2/79 (2,5%) izolata *bla_{KPC}* geni. Geni *bla_{VIM}* i *bla_{IMP}* nisu detektovani.
6. Kod 8/79 (10,1%) izolata *Klebsiella pneumoniae* sa dokazanim karbapenemazama detekovana su 2 gena koja kodiraju karbapenemaze, *bla_{NDM}* i *bla_{OXA-48-like}*. Navedena kombinacija gena je specifična za naše područje i retko se javlja u Evropi.
7. Izolati sa dokazanim karbapenemazama pokazuju rezistenciju na veći broj antibiotika u odnosu na izolate koji ne proizvode karbapenemaze. Poređenjem minimalnih inhibitornih koncentracija utvrđena je statistički značajna razlika za amikacin, gentamicin, ertapenem, meropenem i imipenem kod izolata koji proizvode karbapenemaze i izolata koji ne proizvode karbapenemaze.
8. Kod izolata koji proizvode karbapenemaze evidentiran je određeni procenat rezistencije za tigeciklin (17,5%), fosfomicin (7,6%) i kolistin (5,1%). Kako se

navedeni lekovi koriste u preporučenim terapijskim protokolima za lečenje infekcija izazvanih izolatima koji produkuju karbapenemaze, neophodno je ispitati njihovu osetljivost kod svakog izolata sa dokazanim karbapenemazama u cilju odabira efikasne kombinacije lekova.

9. Dokazano je klonalno širenje multirezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* koji produkuju NDM i OXA-48-like enzime u okviru jedne zdravstvene institucije i među različitim zdravstvenim ustanovama.
10. Na osnovu prvih sveobuhvatnih podataka o prisustvu karbapenemaza na našem području, sve izolate enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme bi trebalo ispitati u pravcu produkcije karbapenemaza bez obzira na metod određivanja osetljivosti. Testove za fenotipsku detekciju karbapenemaza bi trebalo koristiti u mikrobiološkim laboratorijama u skladu sa važećim evropskim preporukama, a konačnu potvrdu mehanizma rezistencije treba izvršiti molekularnim metodama u referentnoj laboratoriji.

8 LITERATURA

1. Galan JC, Gonzalez-Candelas F, Rolain JM, Canton R. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the beta-lactamases world. *Front Microbiol.* 2013;4:9.
2. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. 2003;36(Suppl1):11–23.
3. Topisirovic L, Jovicic B. Antibiotici: molekularni mehanizmi delovanja i rezistencije. 1st ed. Beograd: Alta Nova; 2013.
4. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):820–55.
5. World Health Organisation. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. World Health Organisation. 2011.
6. Van der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(9):2090–100.
7. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015;5(1):21.
8. 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.* 2011;18(3):268–81.
9. Kocsis B, Szabó D. Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: Méndez-Vilas A, ed. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Badajoz: Formatex Research Center; 2013. p. 251-7.
10. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012;18(5):263–72.
11. Da Silva GJ, Mendonça N, Silva G Da. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence.* 2012;3(1):18–28.
12. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 2007;4(2):134–63.

13. Croxen M a, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):26–38.
14. Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(6-7):503–11.
15. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol*. 2013;4(9):1–13.
16. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(5):358–73.
17. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18(4):353–8.
18. Jelesic Z, Gusman V, Mihajlovic-Ukropina M, Kulauzov M, Medic D. Resistance of *Escherichia coli* from healthy donors and from food: an indicator of antimicrobial resistance level in the population. *Med Pregl*. 2011;64(7-8):397–402.
19. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouveleki LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):395–7.
20. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413–31.
21. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2014;9(9):1071–81.
22. Gupta A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-*Klebsiella pneumoniae*. *Semin Perinatol*. 2002;26(5):340–5.
23. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;4(2):107–18.
24. Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends*. 2016;10(1):14–21.
25. Schroll C, Barken KB, Krogfelt K a, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2010;10:179.
26. Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology*. 2003;149(9):2397–405.

27. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.
28. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1–12.
29. Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the paradigm. *Microbiol Spectr.* 2014;2(5):1–15.
30. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736–55.
31. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *herapeutic Adv Infect Dis.* 2016;3:15–21.
32. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943–60.
33. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):9654–92.
34. Moellering RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1989;24 Suppl A:1–7.
35. Zervosen A, Sauvage E, Frere JM, Charlier P, Luxen A. Development of new drugs for an old target - the penicillin binding proteins. *Molecules.* 2012;17(11):12478–505.
36. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014;44(2):51–6.
37. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(2):1-20.
38. Bush K. The ABCD's of beta-lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 2013;19(4):549–59.
39. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(3):259–63.

40. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31.
41. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 1973;9:31-88.
42. Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33.
43. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.
44. Jaurin B, Grundström T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(8):4897-901.
45. Huovinen P, Huovinen S, Jacoby G a. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(1):134-6.
46. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277(1):84-90.
47. Tan TY, Ng LSY, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):146-9.
48. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82.
49. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods. *European Journal of Clinical Microbiology.* 1987;6(4):439-45.
50. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1-11.
51. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):3203-6.
52. 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):659-67.
53. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella*

- pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315–7.
54. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(8):1131–6.
 55. 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.
 56. Denton M. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(Suppl.3). S9-22.
 57. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(8):1243–6.
 58. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294–8.
 59. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(12):3595–8.
 60. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(1):79–101.
 61. Coelho A, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, Alonso-Tarres C, Mirelis B, Larrosa MN, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(1):73–8.
 62. Mahrouki S, Belhadj O, Chihi H, Mohamed BM, Celenza G, Amicosante G, et al. Chromosomal *bla*CTX-M-15 associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. *J Med Microbiol*. 2012;61(Part 9):1286–9.
 63. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6-7):305–17.
 64. Bonnet R. Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother*. 2004;48(1):1–14.
 65. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(Suppl.1):33–41.
 66. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-

- spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012;12(5):883–93.
67. Paterson DL, Bonomo R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–86.
 68. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8.
 69. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–58.
 70. Naas T, Dortet L, Iorga B. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Curr Drug Targets.* 2016;[Epub ahead of print].
 71. Núñez LE, Méndez C, Braña AF, Blanco G, Salas JA. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem Biol.* 2003;10(4):301–11.
 72. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. 2007;60:470–82.
 73. Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouveleki LS. Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at ambler positions 104 and 170 in GES beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4864–71.
 74. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(6):1262–70.
 75. Fairfax M, Queenan A, Lephart P, Kaye K, Dror M, Arnous N, et al. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(3):325–6.
 76. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(9):2080–6.
 77. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, et al. First Class A Carbapenemase Isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):1068–9.
 78. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):260–4.
 79. Yu Y, Du X, Zhou Z, Chen Y, Li L-J. First Isolation of blaIMI-2 in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob agents Chemother.* 2006;50(4):1610–2.

80. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. 2001;45(4):1151–61.
81. Jacoby G, Bush K. Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes [Internet]. Lahey clinic. 2015 [cited 2016 Apr 15]. Available from: <http://www.lahey.org/Studies>
82. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228–36.
83. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: A survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(28):pii=20525.
84. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1553–5.
85. Bennett JW, Herrera ML, Lewis JS, Wickes BW, Jorgensen JH. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):292–4.
86. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*KPC-2 gene. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(9):1349–56.
87. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1257–63.
88. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):2066–9.
89. Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of FRI-1, a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7420–5.
90. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol. Rev*. 2005;18(2):306–25.
91. Wang J-F, Chou K-C. Metallo-beta-lactamases: structural features, antibiotic recognition,

- inhibition, and inhibitor design. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(10):1242–53.
92. Kuwabara S. Purification and properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J*. 1970;103:1963–6.
 93. Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas spp.* *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(1):44–51.
 94. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsunashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22(4):564–70.
 95. Sekiguchi JI, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):4194–7.
 96. Castanheira M, Toleman M, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4654–61.
 97. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):821–30.
 98. Wendel AF, Brodner AHB, Wydra S, Ressina S, Henrich B, Pfeffer K, et al. Genetic characterization and emergence of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Pseudomonas spp.* and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5162–5.
 99. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147–51.
 100. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):71–8.
 101. Zhao W-H, Hu Z-Q. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37(3):214–26.
 102. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(7):1584–90.

103. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(4):891–7.
104. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol.* 2011;6(3):317–33.
105. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, et al. Ongoing epidemic of *bla*VIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: A prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(1):59–63.
106. Miriagou V, Douzinas E, Papagiannitsis C, Piperaki E, Legakis N, Tzouveleki L. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the *bla*VIM-1-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(6):540–1.
107. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046–54.
108. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*NDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5403–7.
109. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):1693–7.
110. 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(4):499–513.
111. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(6):321–31.
112. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):355–62.
113. Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google maps. *Euro Surveill.* 2014;19(20).pii:20809.
114. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.*

- 2006;57(3):373–83.
115. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):24–38.
 116. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D beta-lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2119–25.
 117. Poirel L, Héritier C, Toün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15–22.
 118. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):E24–6.
 119. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4896–9.
 120. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory detection and clinical implication of oxacillinase-48 like carbapenemase: the hidden threat. *J Glob Infect Dis.* 2016; 8(1):41–50.
 121. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):893–903.
 122. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomás JM, Albertí S, Benedí VJ. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3332–5.
 123. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20-51.
 124. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Page J. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2701–6.
 125. 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.
 126. Laudy AE, Osinska P, Namysłowska A, Zajac O, Tyski S. Modification of the susceptibility of Gram-negative rods producing ESBLs to beta-lactams by the efflux phenomenon. *PLoS One.* 2015;10(3):1–14.

127. Bornet C, Chollet R, Mallea M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pages JM, et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(4):985–90.
128. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(3):487–9.
129. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(2):112–22.
130. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 2015;119(5):1219–33.
131. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum-beta-lactamase-harboring and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1140–6.
132. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2761–6.
133. Hrabak J, Chudackova E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):839–53.
134. Kruse EB, Aurbach U, Wisplinghoff H. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Laboratory detection and infection control practices. *Curr Infect Dis Rep*. 2013;15(6):549–58.
135. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):477–9.
136. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3798–801.
137. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure J, Le P. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3129–35.
138. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-

- lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4083–6.
139. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2986–90.
 140. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1295–302.
 141. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437–40.
 142. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2359–64.
 143. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):88–90.
 144. Hrabák J, Študentová V, Walková R, Žemličková H, Jakubů V, Chudáčková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2441–3.
 145. Lee W, Chung HS, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):227–30.
 146. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):179–94.
 147. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitouta JDD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):3877–80.
 148. Wang L, Gu H, Lu X. A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11(1):9.
 149. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, Ruppelt A, Makarewicz O, Pletz M, et al. Rapid identification of carbapenemase genes in Gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One. Public Library of Science;* 2014;9(7):e102232.

150. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1865–9.
151. Nakano R, Nakano A, Ishii Y, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Kikuchi H, et al. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Infect Chemother.* 2015;21(3):202–6.
152. Barisic I, Mitteregger D, Hirschl AM, Noehammer C, Wiesinger-Mayr H. High diversity of beta-lactamases in the general hospital Vienna verified by whole genome sequencing and statistical analysis. *Infect Genet Evol.* 2014;27:408–17.
153. 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.
154. 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.
155. Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, Potron A, Savelkoul PHM, Vandebroucke-Grauls CMJE, 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):2790–1.
156. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement M100–S23. Wayne, PA, USA: CLSI; 2013.
157. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>. 2015.
158. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):895–904.
159. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(6):881–5.

160. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):682–707.
161. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(9):E412-E415.
162. 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):128–32.
163. 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):321–2.
164. Manchanda V, Rai S, Gupta S, Rautela R, Chopra R, Rawat D, 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):249–53.
165. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 2010;145(3-4):273–8.
166. Cohen J. A coefficient of agreement of nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37–46.
167. Altman, D G. Practical statistics for medical research. 1st ed. London: Chapman and Hall/CRC; 1991.
168. Almirante B, Garnacho-Montero J, Pachón J, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Scientific evidence and research in antimicrobial stewardship. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Suppl 4):56–61.
169. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501–12.
170. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1664–71.

171. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* using meropenem discs supplied with boronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Apr;17(4):552-6.
172. Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(3):598.
173. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3139-44.
174. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1965-9.
175. Zioga A, Miriagou V, Tzelepi E, Douzinas E, Tsakiri M, Legakis NJ, et al. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(2):190-1.
176. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602.
177. Pillai DR, McGeer A, Low DE. New Delhi metallo-beta-lactamase-1 in *Enterobacteriaceae*: emerging resistance. *Cmaj.* 2011;183(1):59-64.
178. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-95.
179. Sassi A, Loucif L, Gupta SK, Dekhil M, Chettibi H, Rolain JM. NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology; 2014;58(9):5606-8.
180. Grisold AJ, Zarfel G, Honigl M, Valentin T, Salzer HJ, Leiter E, et al. Emergence of New Delhi metallo-(beta)-lactamase (NDM-1)-producing *Enterobacteriaceae* in Austria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:S137-8.
181. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(11):4914-6.
182. Bogaerts P, Bouchahrouf W, De Castro RR, Deplano A, Berhin C, Pierard D, et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3036-8.

183. Chudackova E, Zemlickova H, Studentova V, Bergerova T, Hrabak J. Carbapenemase producers in the Czech Republic-current situation. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:471.
184. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1260–2.
185. Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. International transfer of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2011;55(4):1821–2.
186. Bathoorn E, Friedrich AW, Zhou K, Arends JP, Borst DM, Grundmann H, et al. Latent introduction to the Netherlands of multiple antibiotic resistance including NDM-1 after hospitalisation in Egypt, August 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(42):pii=20610.
187. Waterman PE, McGann P, Snesrud E, Clifford RJ, Kwak YI, Munoz-Urbizo IP, et al. Bacterial peritonitis due to *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 with plasmid-borne New Delhi metallo-beta-lactamase in Honduras. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4584–6.
188. Chu YW, Tung VWN, Cheung TKM, Chu MY, Cheng N, Lai C, et al. Carbapenemases in enterobacteria, Hong Kong, China, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):130–2.
189. McDermott H, Morris D, McArdle E, O'Mahony G, Kelly S, Cormican M, et al. Isolation of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland, July 2011. *Euro Surveill.* 2012;17(7):pii=20087.
190. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Cordovana M, Farruggia P, Panico M, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(47):pii=20027.
191. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezalgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Microb Drug Resist.* 2013;19(1):30–6.
192. Cabanes F, Lemant J, Picot S, Simac C, Cousty J, Jalin L, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* metallo-beta-lactamase (NDM-1) producers on reunion island. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3812.
193. Lachish T, Elimelech M, Arieli N, Adler A, Rolain J, Assous M. Emergence of New Delhi metallo-β-lactamase in Jerusalem, Israel. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40:566–7.
194. Chihara S, Okuzumi K, Yamamoto Y, Oikawa S, Hishinuma A. First case of New Delhi metallo-beta-lactamase1-producing *Escherichia coli* infection in Japan. *Clin Infect Dis.* 2011;52:153–4.

195. Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, et al. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1433–6.
196. Lowe CF, Kus J V, Salt N, Callery S, Louie L, Khan M a, et al. Nosocomial transmission of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(1):49–55.
197. Liu C, Qin S, Xu H, Xu L, Zhao D, Liu X, et al. New Delhi Metallo- β -Lactamase 1(NDM-1), the dominant carbapenemase detected in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* from Henan Province, China. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135044.
198. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):934–6.
199. Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, De La Barrera LM, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1957–60.
200. Jamal W, Rotimi V, Albert M, Khodakhast F, Udo E, Poirel L. Emergence of nosocomial New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:183–4.
201. Pfeifer Y, Witte W, Holfelder M, Busch J, Nordmann P, Poirel L. NDM-1-producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1318-9.
202. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Kirikae T, et al. NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2394–6.
203. Samuelsen Orjan, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kummel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):670-2.
204. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Jun;39(6):529-33.
205. Ahmad N, Hashim R, Shukor S, Mohd Khalid KN, Shamsudin F, Hussin H. Characterization of the first isolate of *Klebsiella pneumoniae* carrying New-Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and other extended spectrum beta-lactamase genes from

- Malaysia. *J Med Microbiol.* 2013;62(5):804–6.
206. Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(12):2781–3.
207. Poirel L, Lascols C, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Mauritius. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan; 56(1): 598–9.
208. Barrios H, Silva-Sanchez J, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Sanchez-Francia D, Aguirre-Torres J a, et al. Detection of a NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST22) clinical isolate at a pediatric hospital in Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(3):335.
209. Poirel L, Maskari Z Al, Rashdi F Al, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(2):304–6.
210. Ageevets VA, Partina I V., Lisitsyna ES, Ilina EN, Lobzin Y V., Shlyapnikov SA, et al. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Aug;44(2):152-5.
211. Wang SJ, Chiu SH, Lin YC, Tsai YC, Mu JJ. Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* carrying New Delhi metallo-beta-lactamase gene (NDM-1) in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(2):248–9.
212. Nasr A Ben, Decré D, Compain F, Genel N, Barguelli F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):4089-90.
213. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2929–33.
214. Ho HJ, Toh CY, Ang B, Krishnan P, Lin RTP, La M Van, et al. Outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Enterobacter cloacae* in an acute care hospital general ward in Singapore. *Am J Infect Control.* 2016;44(2):177–82.
215. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu WM, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:870–8.
216. Papagiannitsis C, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T, Hrabak J, Radej J, et al. Identification of a New Delhi metallo-β-lactamase-4 (NDM-4)-producing *Enterobacter cloacae* from a Czech patient previously hospitalized in Sri Lanka. *Folia Microbiol (Praha).* 2013;58(6):547–9.

217. 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):1730–3.
218. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J, Grisold A, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(46):pii=19716.
219. 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):3929–31.
220. Poirel L, Savov E, Nazli A, Trifonova A, Todorova I, Gergova I, et al. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2472–4.
221. Novovic K, Filipic B, Veljovic K, Begovic J, Mirkovic N, Jovcic B. Environmental waters and *bla*NDM-1 in Belgrade, Serbia: endemicity questioned. *Sci Total Environ.* 2015;511:393–8.
222. Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenić B, Kalenić S, et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):532–4.
223. Zujic Atalic V, Bedenic B, Kocsis E, Mazzariol A, Barisic M, Plecko V, et al. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia-the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Nov;20(11):O894-903.
224. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J, Bošnjak Z, Varda-Brkić D, Lukić-Grić A, et al. Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class d carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genet Evol.* 2016;43:74–82.
225. Szekely E, Damjanova I, Janvari L, Vas KE, Molnar S, Bilca DV, et al. First description of *bla*NDM-1, *bla*OXA-48, *bla*OXA-181 producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(8):697–700.
226. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1369–73.
227. Matar GM, Cuzon G, Araj GF, Naas T, Corkill J, Kattar MM NP. Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(9):887–8.
228. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181

- carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):E144–8.
229. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597–606.
230. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(1):91–3.
231. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT, Araj GF MG. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010;104(4):327–30.
232. Thomas C, Moore L, Elamin N, Doumith M, Zhang J, Maharjan S, et al. Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(6):531–6.
233. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2420–3.
234. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3463–4.
235. Livermore D. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(Suppl 1):i29–36.
236. Kalpoe JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an ambler class D OXA-48-type beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in the Netherlands. *J Med Microbiol.* 2011;60(5):677–8.
237. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4398–401.
238. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2125–8.
239. Giani T, Conte V, Di Pilato V, Aschbacher R, Weber C, Larcher C, et al. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2211–3.

240. Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen MT, Poirel L, Nordmann P, Hächler H, Stephan R. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 β -lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015;4:9.
241. Pirs M, Andlovic A, Cerar T, Zohar-Cretnik T, Kobola L, Kolman J, et al. A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(50):pii=20042.
242. Jánvári L, Damjanova I, Lázár A, Rác K, Kocsis B, Urbán E, et al. Emergence of OXA-162-producing *Klebsiella pneumoniae* in Hungary. *Scand J Infect Dis*. 2014;46(4):320–4.
243. Barguigua A, El otmani F, Lakbakbi el yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *Apmis*. 2013;121(7):675–7.
244. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med*. 2015;35(3):382–3.
245. Al-Marzooq F, Ngeow YF, Tay ST. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing dual carbapenemases (NDM-1 and OXA-232) and 16S rRNA methylase (armA) isolated from a Malaysian patient returning from India. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(4):445–6.
246. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of *Escherichia coli*, CO-producing NDM-1 and OXA-48 carbapenemases, in urinary isolates, at a tertiary care centre at central India. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(6):2012–5.
247. Balm MND, La M V., Krishnan P, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):E421-E423.
248. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):381–93.
249. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010;15(46):pii=19711.
250. Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo- β -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase, and CMY-4 AmpC β -lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(12):4198–201.
251. Rajabnia R, Asgharpour F, Shahandashti EF, Moulana Z. Nosocomial emerging of (VIM1) carbapenemase-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in North of Iran. 2015;7(2):88–93.

252. Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim K, Park YH, Yum JH, et al. Increasing prevalence and diversity of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1884–6.
253. Marcano D, Pasterán F, Rapoport M, Faccione D, Ugarte C, Salgado N, et al. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2008;2(3):241–4.
254. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008;13(4):pii=8023.
255. Juhász E, Jánvári L, Tóth A, Damjanova I, Nobilis A, Kristóf K. Emergence of VIM-4- and SHV-12-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Int J Med Microbiol.* 2012;302(6):257–60.
256. Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, et al. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(3):306–10.
257. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Yang Q, Yu N, Sun Z, et al. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (*bla*KPC-2 plus *qnrB4*) and a *bla*IMP-4 gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):798–9.
258. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*IMP-4 among gram negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis.* 2005;41(11):1549–56.
259. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):695–6.
260. Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R. Isolation of the first metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quim.* 2008;21(2):123–6.
261. Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF, Zhu W, Kitchel B, Watz N, et al. IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4239–45.
262. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. 2005;43(1):516–9.
263. Hamzan NI, Yean CY, Rahman RA, Hasan H, Rahman ZA. Detection of *bla*IMP4 and *bla*NDM1 harboring *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital in Malaysia.

- Emerg Health Threats J. 2015;8:26011.
264. Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, et al. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing *Enterobacteriaceae* in Thailand. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2626–30.
265. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(12):6344–7.
266. Mirovic V, Carevic B, Stepanovic S, Lepsanovic Z. An outbreak of infection due to metallo-beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* in the surgical intensive care unit. Scr Med. 2011;42:75–9.
267. Toth A, Damjanova I, Puskas E, Janvari L, Farkas M, Dobak A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(7):765–9.
268. Markovska R, Schneider I, Stoeva T, Bojkova K, Boyanova L, Bauernfeind A. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:252–3.
269. Tsai YK, Liou CH, Fung CP, Lin JC, Siu LK. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. PLoS One. 2013;8(11):1–8.
270. Vading M, Samuelsen, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infect. 2011;17(5):668–74.
271. Woodford N, Dallow J, Hill R, Palepou M, Pike R, Ward M, et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. Int J Antimicrob Agents. 2007;29(4):456–9.
272. Moland ES, Seong GH, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(2):800–1.
273. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):3018–20.
274. Daikos G, Petrikos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-β-lactamase on the

- outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1868–73.
275. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1028–33.
276. Woodford N, Tierno PJ, Young K, Tysall L, Palepou M, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4793–9.
277. Gregory C, Llata E, Stine N, Gould C, Santiago L, Vazquez G, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(5):476–84.
278. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter species*: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1413–8.
279. Cubero M, Cuervo G, Dominguez MÁÁ, Tubau F, Martí S, Sevillano E, et al. Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):177.
280. Aschbacher R, Giani T, Corda D, Conte V, Arena F, Pasquetto V, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* during 2011-12 in the Bolzano area (Northern Italy): increasing diversity in a low-endemicity setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(4):354–6.
281. Huang S-R, Liu M-F, Lin C-F, Shi Z-Y. Molecular surveillance and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012;47(3):1–10.
282. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):654–63.
283. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):102–11.
284. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*:

- Superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2108–13.
285. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012;55(7):943–50.
286. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1611–2.
287. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, et al. *In vitro* interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2395–7.
288. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2009;49(2):271–4.
289. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, et al. *In vitro* activity of fosfomicin against *bla*KPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):526–9.
290. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(1):8–15.
291. Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):697–701.
292. Bae IK, Kang HK, Jang IH, Lee W, Kim K, Kim JO, et al. Detection of carbapenemases in clinical *Enterobacteriaceae* isolates using the VITEK AST-N202 card. *Infect Chemother.* 2015;47(3):167–74.
293. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2009;47(3):785–6.
294. Pailhories H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarie C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. *Int J Infect Dis.* 2014;18(1):94–6.

295. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen S, Melano R, Patel S. what is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in low-prevalence settings? *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(3):1556–9.
296. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk J m, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4):pii=20380.
297. Voets GM, Leverstein-Van Hall MA, Kolbe-Busch S, Zanden A Van Der, Church D, Kaase M, et al. International multicenter evaluation of the Diversilab bacterial typing system for *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):3944–9.