

Sveučilište u Splitu  
MEDICINSKI FAKULTET

ŽANA RUBIĆ, dr. med.

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA  
β-LAKTAMSKE REZISTENCIJE  
I KLINIČKE ZNAČAJKE  
VIŠESTRUKO OTPORNIH IZOLATA  
VRSTE *Proteus mirabilis***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr. sc. Marija Tonkić, dr. med.

Split, 2024.

University of Split  
SCHOOL OF MEDICINE

ZANA RUBIC, MD

**MOLECULAR CHARACTERIZATION  
OF B-LACTAM RESISTANCE  
AND CLINICAL FEATURES  
OF MULTIDRUG-RESISTANT  
*Proteus mirabilis* ISOLATES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Prof. Marija Tonkic, MD. PhD.

Split, 2024.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split, i na Odjelu za bakteriologiju i bolničke infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, u okviru doktorskog studija „Translational research in Biomedicine - TRIBE“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem svojoj mentorici, predstojnici Kliničkog zavoda za mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Split i pročelnici katedre za Medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, prof. dr. sc. Mariji Tonkić, dr.med., na beskrajnoj podršci i savjetima koje su mi bili od velike pomoći.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama iz Kliničkog zavoda za mikrobiologiju na pruženoj podršci na ovom putu.

Posebno zahvaljujem kolegicama i kolegama s Odjela za bakteriologiju i bolničke infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, Silviji Šoprek Strugar, dr.med., dr. sc. Marku Jeliću, mag. biol. mol. i prof.dr.sc. Arjani Tambić Andrašević, dr.med., koji su uvijek imali vremena za mene u svom zgusnutom rasporedu.

Hvala dr. sc. Anji Oberiter Korbar i dr.sc. Vesni Lužar-Stiffler na neprocjenjivim savjetima i pomoći u statističkoj obradi podataka.

I na kraju, najviše zahvaljujem svojoj voljenoj obitelji na ljubavi, strpljenju, razumijevanju i vjeri u uspjeh.

## POSVETA

Doktorsku disertaciju posvećujem majci Zori i ocu Bogdanu. Hvala vam što ste bili divni roditelji, i što ste mi usadili nepresušnu želju za istraživanje svijeta i pomaganje ljudima. Ovaj rad to objedinjuje.

*“I am among those who think that science has a great beauty. A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”*

— Marie Curie

## SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica .....	9
<b>1. UVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Značajke roda <i>Proteus</i> i vrste <i>Proteus mirabilis</i></b> .....	<b>13</b>
1.1.1. Povijest i taksonomija roda <i>Proteus</i> .....	13
1.1.2. Laboratorijske značajke vrste <i>P. mirabilis</i> .....	13
1.1.3. Patogeneza infekcija koje uzrokuje <i>P. mirabilis</i> .....	14
1.1.4. Razvoj rezistencije na $\beta$ -laktamske antibiotike u vrsti <i>P. mirabilis</i> .....	16
1.1.4.1. $\beta$ -laktamaze uskog spektra u vrsti <i>P. mirabilis</i> .....	16
1.1.4.2. $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL) u vrsti <i>P. mirabilis</i> .....	16
1.1.4.3. Karbapenemaze u vrsti <i>P. mirabilis</i> .....	17
<b>1.2. AmpC <math>\beta</math>-laktamaze</b> .....	<b>19</b>
1.2.1. Povijest AmpC $\beta$ -laktamaza .....	19
1.2.2. Enzimske značajke AmpC $\beta$ -laktamaza .....	19
1.2.3. Fizikalne i strukturne značajke AmpC $\beta$ -laktamaza .....	21
1.2.4. Regulacija AmpC $\beta$ -laktamaza .....	21
1.2.5. Indukcijske sposobnosti $\beta$ -Laktama na ekspresiju <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> gena .....	22
1.2.6. AmpC $\beta$ -laktamaze posredovane plazmidom .....	24
1.2.7. Genetički elementi uključeni u mobilizaciju gena za AmpC $\beta$ -laktamazu .....	24
1.2.8. Hiperprodukcija AmpC $\beta$ -laktamaze .....	24
1.2.9. AmpC cefalosporinaze proširenog spektra (ESACs) .....	25
1.2.10. Dokazivanje AmpC $\beta$ -laktamaza .....	26

1.2.11. Uloga molekularne epidemiologije u praćenju širenja višestruko otpornih enterobakterija .....	27
1.2.12. Liječenje infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče AmpC $\beta$ -laktamaze .....	27
<b>1.3. AmpC <math>\beta</math>-laktamaze u vrsti <i>Proteus mirabilis</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>1.4. Primjerenost empirijskog antimikrobnog liječenja infekcija uzrokovanih višestruko otpornim izolatima vrste <i>Proteus mirabilis</i> koji luče AmpC <math>\beta</math>-laktamazu .....</b>	<b>33</b>
<b>2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Ustroj istraživanja .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Materijali istraživanja .....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Bakterijski izolati uključeni u studiju .....	40
3.2.2. Klinički podaci ispitanika uključenih u studiju .....	40
<b>3.3. Metode istraživanja .....</b>	<b>43</b>
3.3.1. Identifikacija prikupljenih bakterijskih izolata .....	43
3.3.2. Fenotipska karakterizacija $\beta$ -laktamske rezistencije .....	43
3.3.3. Molekularna epidemiologija .....	43
3.3.4. Molekularna karakterizacija $\beta$ -laktamske rezistencije .....	43
3.3.5. Lokalizacija <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> gena i detekcija elementa <i>ISEcp1</i> .....	44
3.3.6. Ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove .....	44
3.3.7. Statistički postupci u obradi prikupljenih kliničkih podataka .....	45
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Studijski izolati .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Karakteristike izolata u fenotipskoj detekciji <math>\beta</math>-laktamske rezistencije .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. Klonska povezanost izolata .....</b>	<b>48</b>

<b>4.4. Molekularna karakterizacija i lokacija gena za <math>\beta</math>-laktamazu i insercijskog elementa <i>ISEcp1</i></b>	52
<b>4.5. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti izolata</b>	52
<b>4.6. Povezanost rizičnih čimbenika s pojavom sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima vrste <i>Proteus mirabilis</i> koji luče AmpC <math>\beta</math>-laktamazu</b>	54
4.6.1. Prikupljeni podatci	54
4.6.2. Rezultati univarijatne opisne statistike	54
4.6.3. Rezultati bivarijatne analize asocijacija kategorijskih varijabli s MDRPM i OPM skupinama pacijenata	60
4.6.4. Rezultati logističke regresijske analize za predviđanje vjerojatnosti obolijevanja od sepse koju uzrokuje višestruko otporni <i>P. mirabilis</i> , na osnovu izmjerenih obilježja	63
<b>4.7. Povezanost sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima <i>Proteus mirabilis</i> koji luče Ampc <math>\beta</math>-laktamazu i primjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja</b>	67
4.7.1. Rezultati univarijatne opisne statistike	67
4.7.2. Rezultati bivarijatne analize asocijacije primjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja s MDRPM i OPM skupinama pacijenata	67
4.7.3. Rezultati logističke regresijske analize za predviđanje vjerojatnosti primjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja u odnosu na sepsu kojoj je uzročnik višestruko otporni ili osjetljivi <i>P. mirabilis</i>	68
<b>4.8. Povezanost empirijski primijenjenog antimikrobnog lijeka u prva 24 h i mikrobiološke eradikacije u periodu od 72 h od pojave sepse</b>	71
<b>5. RASPRAVA</b>	75
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	91
<b>7. SAŽETAK</b>	94
<b>8. SUMMARY</b>	97
<b>9. POPIS LITERATURE</b>	100

<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	117
<b>11. PRIVITAK</b> .....	126



## POPIS OZNAKA I KRATICA

ABL - AmpC  $\beta$ -laktamaza (engl. *AmpC beta-lactamase*)

AIC – Akaike informacijski kriterij (engl. *The Akaike information criterion*)

BSAC - Britansko društvo za antimikrobnu kemoterapiju (engl. *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*)

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019 (engl. *Coronavirus disease 2019*)

DDST - test sinergizma dva diska (engl. *double disk synergy test*)

DG - donja granica 95%-tnog intervala pouzdanosti za omjer izgleda

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ECOFFs - epidemiološke granične vrijednosti (engl. *epidemiological cut-off values*)

ESAC – AmpC cefalosporinaza proširenog spektra (engl. *extended-spectrum AmpC cephalosporinase*)

ESBL -  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum beta-lactamase*)

ESCPM skupina – skupina koja obuhvaća vrste *Enterobacter* (*Enterobacter cloacae complex*, *Enterobacter aerogenes*), *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* i *Morganella morganii*

EUCAST – Europsko povjerenstvo za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

ESCMID - Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (engl. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*)

GG - gornja granica 95%-tnog intervala pouzdanosti za omjer izgleda

I – umjereno osjetljiv ili osjetljiv uz povećanu izloženost lijeku

IDSA - Američko društvo za infektivne bolesti (engl. *Infectious Diseases Society of America*)

IS - insercijska sekvenca

JIL – jedinica intenzivnog liječenja

kb – kilo bazni parovi

KBC – Klinički bolnički centar

kDa - kilodalton

LPS – lipopolisaharid

MALDI-TOF - matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija - analizator vremena leta (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*)

MDRPM - uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse višestruko otporni *Proteus mirabilis* koji luči AmpC  $\beta$ -laktamazu

MH - Mueller-Hinton podloga

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MR/P – manoza neosjetljive *Proteus*-like fimbrije

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

OPM - uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse višestruko osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči AmpC  $\beta$ -laktamazu

PAI - otok patogenosti (engl. *pathogenicity island*)

pb – parovi baza

PBPs - proteini koji vežu penicilin (engl. *penicillin-binding proteins*)

PFGE - gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*)

PT=da – primjerena empirijska antimikrobna terapija

PT=ne – neprimjerena empirijska antimikrobna terapija

RA – reumatoidni artritis

ROC curve- krivulja operativnih karakteristika (engl. *receiver operating characteristic curve*)

S - osjetljiv uz standardno doziranje

WGS - sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*)

## 1. UVOD

## 1.1. Značajke roda *Proteus* i vrste *Proteus mirabilis*

### 1.1.1. Povijest i taksonomija roda *Proteus*

*Proteus mirabilis* je gram-negativna bakterija iz roda *Proteus*, porodice *Morganellaceae* i reda *Enterobacterales*, široko rasprostranjena u okolišu i dio crijevne mikrobiote ljudi i životinja (1). Rodu *Proteus* trenutno pripada šest vrsta (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. cibarius*, *P. terrae* i *P. hauseri*) i tri neimenovane genomske vrste (*Proteus* genomospecies 4, 5 i 6) (2). Rod je izvorno imao dvije vrste: *P. mirabilis* i *P. vulgaris*, koje je prvi opisao Hauser 1885. godine (3). Uočio je "fenomen rojenja ili puzanja", odnosno njihovu sposobnost karakterističnog prerastanja površine podloge, i podijelio je sojeve u dvije vrste na temelju brzine hidrolize želatine. Pojam *Proteus* ukazuje na promjenjivost oblika, a ime je dobio prema jednom od bogova mora iz Homerovog epa "Odiseja", koji je imao dar beskrajne transformacije. Šezdesetih godina prošlog stoljeća dokazano je da u vegetativnom obliku *P. mirabilis* ima formu kratkih pokretnih bacila, duljine 1 do 2  $\mu\text{m}$ , sa 6 do 10 peritrihnih flagela. Međutim, kad uvjeti to dopuštaju, preoblikuje se u formu koja ima sposobnost rojenja, pri čemu se stanice izdužuju 20 do 50 puta, na duljinu od 20 do 80  $\mu\text{m}$ , i izražavaju stotine do tisuće flagela (4).

Prvotne taksonomske podijele radile su se prvenstveno na temelju uočenih razlika dobivenih promatranjem kultura i analizom fenotipova, poput sposobnosti fermentacije glukoze, laktoze, saharoze i maltoze, te proizvodnje sumporovodika i plina (1). Tek je razvoj molekularnih metoda omogućio svrstavanje vrsta u njihove današnje rodove.

*P. mirabilis*, *P. vulgaris* i *P. penneri* opisani su kao oportunistički uzročnici infekcija ljudi, a među njima je *P. mirabilis* daleko najčešće izolirana vrsta iz kliničkih uzoraka (2).

### 1.1.2. Laboratorijske značajke vrste *P. mirabilis*

U mikroskopskom preparatu, vrste roda *Proteus* imaju morfologiju gram-negativnih bacila koji ne stvaraju spore. U odnosu na atmosferske uvjete inkubacije, fakultativni su anaerobi.

Na podlozi krvnog agara, pokazuju karakteristično rojenje, a na diferencijalnim podlogama s laktozom, neće je fermentirati. Svi stvaraju sumporovodik, i imaju snažnu aktivnost ureaze koja hidrolizira ureu na amonijak i ugljikov dioksid, što predstavlja značajnu ulogu u patogenezi infekcija. *P. mirabilis* je negativan u indol testu s para-dimetilaminobenzaldehidom, što ga razlikuje od vrste *P. vulgaris*, a pozitivan u testu na ornitin dekarboksilazu, što ga razlikuje od vrste *P. penneri* (1).

### 1.1.3. Patogeneza infekcija koje uzrokuje *P. mirabilis*

*P. mirabilis* je uzročnik izvanbolničkih i bolničkih infekcija različitih organskih sustava, a najčešće uzrokuje infekcije mokraćnog sustava i rana (1). Otkriven je velik broj različitih čimbenika virulencije kojima postiže patogeni učinak.

Stvaranje enzima ureaze jedno je od ključnih značajki ove vrste i nedvojbeno je povezano s nastankom kamenaca u mokraćnom sustavu (5). Razgradnjom uree nastaje amonijak koji podiže pH urina, pa se inače topivi polivalentni anioni i kationi talože i formiraju struvit i karbonatni apatit.

*P. mirabilis* izbjegava urođeni imunološki odgovor na više načina. Stvoreni mokraćni kamenac ga štiti od leukocita i antimikrobnih peptida (6). Posjeduje intrinzičnu otpornost na antimikrobne peptide, pogotovo polimiksine, zahvaljujući ZapA metaloproteazi širokog spektra koja razgrađuje i imunoglobuline, proteine komplementa, fibronektin, aktin, kolagen, laminin, kazein te želatinu (6). Otpornost na antimikrobne peptide prisutna je i zbog promjena u površinskom naboju lipopolisaharida (LPS) (6). Također, *P. mirabilis* stvara inhibitor lizozima PliC (6). U izbjegavanju urođenog i stečenog imuniteta pomaže mu i fazno promjenjiva ekspresija antigena na površini bakterijske stanice, koju dokazano pokazuju manoza neosjetljive *Proteus*-like fimbrije (MR/P) i flagele (6). Fimbrije vrste *Proteus* su uvelike proučavane kao čimbenik koji doprinosi virulenciji, a MR/P fimbrije su najopsežnije istražene, i imaju bitnu ulogu u stvaranju kompleksne arhitekture biofilma (6). *P. mirabilis* lako prijanja na razne površine, uključujući klinički relevantne materijale kao što su silikon, lateks i polistiren, što ga čini problematičnim uzročnikom u pacijenata sa trajnim urinarnim kateterima, koje može u potpunosti začepiti (6). Što se tiče flagela, dva gena su odgovorna za stvaranje flagelina u njima, *flaA* i *flaB*. FlaA je prevladavajući flagelin, ali moguće su

rekombinacije između *flaA* i *flaB* gena, što rezultira povremenim hibridima, koji olakšavaju izbjegavanje imunološkog odgovora tijekom infekcije (6).

Među brojnim adhezivnim proteinima koje stvara *P. mirabilis* je i adhezin uroepitelnih stanica, koji, kao što mu naziv kaže, ima važnost u adheziji uroepitelnih stanica (6).

Sekvenciranjem cijelog genoma (*engl. whole genome sequencing; WGS*) uropatogenog soja *P. mirabilis* HI4320, otkriveni su brojni geni za stvaranje potencijalnih toksina, od kojih su tri jasno povezana s patogeneзом infekcija: hemolizin, *Proteus* toksični aglutinin i ZapA metaloproteaza (6). Hemolizin je toksin koji uzrokuje oštećenje stanice stvaranjem pora u fosfolipidnom dvosloju membrane eukariotske stanice. Do sada su u rodu *Proteus* opisana dva tipa hemolizina, *hlyA* koji je ovisan o kalciju i sličan je  $\alpha$ -hemolizinu kojeg ima *Escherichia coli*, i *hpmA* neovisan o kalciju, za kojeg se čini da je dominantan hemolizin u vrsti *P. mirabilis* (6). *Proteus* toksični aglutinin (Pta) je protein povezan s kolonizacijom mokraćnog mjehura i bubrega, i citotoksičnim učinkom (6). Već spomenuta ZapA metaloproteaza povezana je sa smanjenim neutrofilnim odgovorom na infekciju, te jače izraženom bakterijskom kolonizacijom, upalom, i većom razinom oštećenja tkiva (6).

Patogeni sojevi *P. mirabilis* tipično u svom genomu sadrže otoke patogenosti (*engl. pathogenicity islands; PAI*) koji doprinose genomskoj varijabilnosti i virulenciji bakterija. Kao podvrstu PAI, često sadrže integrativni i konjugativni element nazvan ICEPm1, koji se može samostalno replicirati i samostalno prenijeti na druge sojeve i vrste, prenoseći tako gene virulencije i otpornosti na antibiotike (6).

Budući da bakterije i domaćin koriste iste mikronutrijente, jedan od načina na koji se domaćin bori protiv patogena je uklanjanje mikronutrijenata iz područja dohvata bakterija. Bakterije koje su evoluirale da koloniziraju ljude, dakle i *P. mirabilis*, imaju razvijene sustave za hvatanje i unos ovih esencijalnih mikronutrijenata, kao što su željezo, cink, nikal i fosfati, a koji su inducirani tijekom infekcije (6).

Poznavanje i razumijevanje djelovanja čimbenika virulencije koje sadrži *P. mirabilis* doprinosi širem razumijevanju bakterijske patogeneze, i važan je preduvjet bržeg i djelotvornijeg rješavanja zdravstvenog problema uzrokovanog ovom infekcijom, kao i ispravnog izbora preventivnih mjera.

#### **1.1.4. Razvoj rezistencije na $\beta$ -laktamske antibiotike u vrsti *P. mirabilis***

Divlji tip (engl. *wild type*) vrste *P. mirabilis* općenito je dobro osjetljiv na antimikrobne lijekove, uz izuzetak intrinzične otpornosti na nitrofurantoin, tetracikline i polimiksine, te nešto smanjene osjetljivosti na imipenem (1, 2). Međutim, kao i druge vrste enterobakterija, *P. mirabilis* bilježi rastuću pojavu stečene otpornosti na različite antimikrobne lijekove svugdje u svijetu (2). Gotovo sve  $\beta$ -laktamaze opisane u enterobakterijama, opisane su i u vrsti *P. mirabilis*.

##### **1.1.4.1. $\beta$ -laktamaze uskog spektra u vrsti *P. mirabilis***

Među  $\beta$ -laktamazama uskog spektra s fenotipom penicilinaze, TEM-1 je najčešće opisani enzim u sojevima *P. mirabilis*. Hidrolitički profil ovog enzima uključuje peniciline i cefalosporine prve generacije, a dobro se inhibira inhibitorima  $\beta$ -laktamaze kao što su klavulanska kiselina i tazobaktam. Opisano je mnoštvo TEM varijanti, od kojih su neke čak i otporne na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam (7, 8). Oksacilinaze su enzimi koji prvenstveno hidroliziraju kloksacilin i oksacilin, a klavulanska kiselina ili tazobaktam ih inhibiraju slabo ili nikako. U kliničkim izolatima *P. mirabilis* najzastupljenije oksacilinaze uskog spektra su OXA-1, OXA-9, OXA-10 i neki derivati s točkastom mutacijom kao što je OXA-320 (2).

##### **1.1.4.2. $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL) u vrsti *P. mirabilis***

Najčešće opisana stečena otpornost na  $\beta$ -laktamske antibiotike vrste *P. mirabilis* je ona koja nastaje zbog lučenja  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum beta-lactamase*; ESBL). Otpornost uzrokovana AmpC  $\beta$ -laktamazama (engl. *AmpC beta-lactamase*; ABL) je manje česta i dokazuje se drukčijim fenotipskim testovima, a može obuhvatiti širi spektar  $\beta$ -laktamskih antibiotika, uključivo kombinacije  $\beta$ -laktama s inhibitorima  $\beta$ -laktamaze (9). Razvoj rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike u vrsti *P. mirabilis* putem AmpC  $\beta$ -laktamaza opisana je u odjeljku 1.3.

Nekoliko TEM varijanti ESBL enzima identificirano je u vrsti *P. mirabilis*, pa je tako i u izolatima iz Kliničkog bolničkog centra Split (KBC Split) opisana TEM-52 varijanta (10, 11).



Takvi izolati dobro su osjetljivi ili imaju smanjenu osjetljivost na cefotaksim i cefepim, ali su uvijek osjetljivi na ceftazidim i aztreonam (12).

S vremenom se u izolatima *P. mirabilis* sve više opisivala CTX-M varijanta ESBL enzima, čija se oznaka "CTX" odnosi na bolji učinak hidrolize cefotaksima u odnosu na ceftazidim. Divertifikacija ovog enzima uočena je među raznim enterobakterijama, pa je tako i u vrsti *P. mirabilis* opisano preko 150 CTX-M alelnih varijanti (2).

VEB ili "vijetnamski ESBL" prvotno je identificiran 1999. godine u Francuskoj u soju *E. coli* vijetnamskog pacijenta (13), a u *P. mirabilis* je *bla*<sub>VEB-1</sub> gen prvi put opisan u Koreji 2004. godine (14). U Francuskoj je gen *bla*<sub>VEB-6</sub> pronađen zajedno s genom koji kodira NDM-1 karbapenemazu na novom otoku patogenosti nazvanom "*Proteus* genomski otok, PGI1-PmPEL" (15).

PER enzim se strukturno i funkcionalno dosta razlikuje od drugih ESBL enzima i dovodi do otpornosti na peniciline, cefotaksim, ceftazidim i aztreonam (16). PER-1 enzim je rijetko opisan u vrsti *P. mirabilis*, dok je širenje PER-2 ostalo ograničeno na Južnu Ameriku (16, 17).

#### **1.1.4.3. Karbapenemaze u vrsti *P. mirabilis***

Najzastupljenije karbapenemaze u vrstama *Proteus* spp. u Europi su KPC, NDM, VIM i OXA. Osim toga, *Morganellaceae* posjeduju intrinzičnu smanjenu osjetljivost na imipenem, uglavnom zbog smanjenog afiniteta vezanja proteina koji vežu penicilin (PBPs) za imipenem (18), ili gubitka porina ImpR OMP (19).

KPC-2 je enzim koji dovodi do otpornosti na sve  $\beta$ -laktame, uključujući karbapeneme, a prvi put je identificiran u vrsti *P. mirabilis* 2008. godine (20). U Italiji je kao uzročnik sepse izoliran *P. mirabilis* koji je, uz otpornost na ostale antimikrobne skupine, sadržavao gene za čak četiri različite  $\beta$ -laktamaze (CMY-16, TEM-1, OXA-9 i KPC-2). Gen *bla*<sub>KPC-2</sub> bio je prisutan u dvije kopije, ugrađene u dva različita transpozona (21). U Brazilu su prošle godine opisani klinički izolati *P. mirabilis* koji su istovremeno nosili *bla*<sub>OXA-10</sub> i *bla*<sub>KPC</sub> gene, odnosno *bla*<sub>OXA-10</sub> i *bla*<sub>NDM</sub> gene (22).

Metalo- $\beta$ -laktamaze tipa VIM prevladavaju u izolatima *Pseudomonas aeruginosa*, no mogu se naći i u enterobakterijama. U vrsti *P. mirabilis*, prevalencija VIM-1 posebno je visoka

u Grčkoj, gdje je prvi soj opisan 2006. godine (23), a širenje je opisano ne samo u bolničkim već i izvanbolničkim okruženjima (24). U Bugarskoj je nedavno opisano 13 izolata *P. mirabilis* koji luče VIM-1 i CMY-99 (25), dok su dva izolata s istovremenim lučenjem VIM-1 i CMY-16 opisana u Nizozemskoj (26).

"New Delhi metalo- $\beta$ -laktamaza-1" (NDM-1), kao i druge metalo- $\beta$ -laktamaze, dovodi do otpornosti na sve  $\beta$ -laktame uključivo karbapeneme, s izuzetkom aztreonama (27). *P. mirabilis* s  $bla_{NDM-1}$  genom opisan je povremeno u raznim dijelovima svijeta, a u Francuskoj je identificiran kao dio genomskog otoka, ali je razina otpornosti na karbapeneme (s izuzetkom imipenema) ostala prilično niska (15, 22).

Među karbapenemazama Amblerove klase D, enterobakterije najčešće luče OXA-48, ali je ona iznenađujuće rijetko opisana u vrsti *P. mirabilis*. (28, 29). Od drugih značajnije prisutnih OXA enzima, gen za OXA-23 identificiran je na kromosomu *P. mirabilis* zajedno s bliskim genetskim okruženjem tipičnim za *Acinetobacter baumannii* (30, 31). Budući da ona ima relativno nisku hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima, pretpostavlja se da su  $bla_{OXA-23}$  geni prisutniji među enterobakterijama, uključujući *P. mirabilis*, nego što se to dokazuje.

## 1.2. AmpC $\beta$ -laktamaze

### 1.2.1. Povijest AmpC $\beta$ -laktamaza

Unatoč tome što se tada drugačije zvao, prvi enzim koji je 1940. godine objavljen kao enzim koji inaktivira penicilin je zapravo bio AmpC, pronađen u bakteriji *Escherichia coli*, i to prije uvođenja penicilina u široku kliničku uporabu (32). Ta činjenica ukazuje da se radi o vrlo starim enzimima, prisutnim u bakterijama prije uvođenja antibiotika, i dio su mehanizama otpornosti mikroorganizama na prirodne  $\beta$ -laktame u okviru njihovog biološkog natjecanja. Švedski istraživači 1960-tih godina su započeli sustavnu studiju genetike mehanizma rezistencije na penicilin u *E. coli*, i pronađene mutacije su nazvali *ampA* i *ampB*, a potom i *ampC* (33). Premda se većina nomenklature promijenila tijekom godina, ta oznaka je ostala. Sekvenca *ampC* gena iz *E. coli* objavljena je 1981. godine (34). Slijed se razlikovao od  $\beta$ -laktamaza tipa penicilinaze kao što je TEM-1, ali kao i u njih, serin se nalazio na aktivnom mjestu (35).

Do objave Bush-Jacoby-Medeiros funkcionalnog klasifikacijskog sistema  $\beta$ -laktamaza 1995. godine, već je bio poznat velik broj vrsta koje imaju ABL kodirane na kromosomu. Međutim, u kasnim 1980-ima, *ampC* geni kromosomskog porijekla (iz vrsta kao što su *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* itd.) počeli su se identificirati na plazmidima u vrstama koje ih intrinzično nemaju (npr. *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. mirabilis* i *Salmonella* spp.), pa počinje rasti svjesnost o mogućoj prisutnosti takve vrste mehanizma otpornosti neovisno o vrsti bakterije (9).

Otpornost koju stvara lučenje AmpC enzima može se prema tome klasificirati u 3 kategorije: 1) inducibilna kromosomska rezistencija koja se pojavljuje u okruženju  $\beta$ -laktama, 2) stabilna derepresija zbog mutacija u genima za regulaciju lučenja ABL, ili 3) prisutnost plazmidom posredovanog *ampC* gena.

### 1.2.2. Enzimske značajke AmpC $\beta$ -laktamaza

AmpC  $\beta$ -laktamaze su klinički važne cefalosporinaze koje prema Amblerovoj strukturnoj klasifikaciji  $\beta$ -laktamaza pripadaju klasi C, dok su u shemi funkcionalne klasifikacije prema Bush i suradnicima raspoređeni u 1. skupinu (9). Karakterizira ih to što su otporne na klasične kombinacije  $\beta$ -laktama i inhibitora  $\beta$ -laktamaza, i što uz peniciline još aktivnije hidroliziraju cefalosporine, uključujući i srodne cefamicine, koji su inače zbog svoje strukture stabilniji na hidrolizu  $\beta$ -laktamazama (cefoksitin, cefotetan, cefmetazol) (9).

Specifičnost supstrata ovog enzima je široka i obuhvaća sve peniciline, cefalosporine uskog spektra, oksiiinocefalosporine, cefamicine, i varijabilno aztreonam (9). Opisane su i mutacije koje dovode do pojave tzv. AmpC cefalosporinaza proširenog spektra (engl. *extended-spectrum AmpC cephalosporinase*; ESAC), koje zahvaljujući strukturnoj modifikaciji u blizini aktivnog mjesta uspijevaju proširiti spektar hidrolize (36, 37).

Stopa hidrolize aztreonama je niska zbog spore deacilacije, ali je afinitet vezanja enzima za aztreonam visok, što je važno svojstvo pri niskim koncentracijama supstrata. Stopa hidrolize cefalosporina četvrte generacije (npr. cefepim i cefpirom) također je obično niska, a za karbapeneme vrlo niska, pa je osjetljivost na ove lijekove obično održana. Međutim, iako je stopa hidrolize niska, visoki afinitet vezanja enzima uočen je i za cefalosporine četvrte generacije (9). AmpC enzimi se inače nalaze u periplazmatskom prostoru, gdje „hvataju“ i uništavaju  $\beta$ -laktame prije njihove interakcije s ciljnim mjestom djelovanja (PBPs). Cefalosporini četvrte generacije osim relativne stabilnosti na hidrolizu, imaju dodatnu prednost što zbog svoje strukture dvopolariziranog iona brzo prodiru kroz membrane, pa to pridonosi dosta dobro očuvanoj aktivnosti prema većini ABL (9).

Pored stjecanja gena za karbapenemaze, alternativni mehanizam stjecanja rezistencije na karbapeneme je kombinacija lučenja  $\beta$ -laktamaza koje nemaju značajan hidrolitički učinak na karbapeneme, poput ABL, i promjena porina vanjske membrane koje ometaju ulazak antibiotika (38). U ovom slučaju, vrlo slaba aktivnost prema karbapenemima koju pokazuju neki AmpC enzimi, može udruženo ipak pridonijeti fenotipu smanjene osjetljivosti ili otpornosti na karbapeneme. Uz to, promjene koje dovode do povećane ekspresije gena za ABL, i/ili promjene koje utječu na aktivnost efluksnih pumpi mogu povećati sveukupni učinak otpornosti na karbapeneme (38, 39).

Inhibitori  $\beta$ -laktamaza koji su djelotvorni na enzime klase A, primjerice klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam, značajno su manje djelotvorni na ABL (9). Međutim, ove opće funkcionalne značajke mogu pokazivati neke varijabilnosti u odnosu na različite AmpC enzime, u smislu specifičnosti supstrata (primjerice tazobaktam dobro inhibira kromosomsku ABL u vrsti *Morganella morganii*) (9). P-kloromerkuribenzoat slabo inhibira ABL, a EDTA je uopće ne inhibira. Kloksacilin, oksacilin i aztreonam su dobri inhibitori (9), kao i inhibitori novije generacije koji se ne temelje na  $\beta$ -laktamu (npr. diazabiciklooktani, kao što su avibaktam i relebaktam, i boronati, kao što je vaborbaktam) (40).

Temocilin je  $\beta$ -laktamski antibiotik (6- $\alpha$ -metoksi derivat tikarcilina) koji se pokazao vrlo stabilnim protiv većine  $\beta$ -laktamaza, uključujući ESBL-a i ABL (41).

### 1.2.3. Fizikalne i strukturne značajke AmpC $\beta$ -laktamaza

AmpC  $\beta$ -laktamaze su enzimi molekularne mase od 34 do 40 kDa, s izoelektričnom točkom obično iznad 8.0 (izuzetak su izoelektrične točke FOX enzima posredovanih plazmidom koje su od 6.7 do 7.2, i izoelektrična točka enzima kojeg stvara *Morganella morganii* s izoelektričnom točkom od 6.6) (9).

Trodimenzionalna struktura različitih AmpC enzima je većinom slična: sastoji se od  $\alpha$ -spiralne domene na jednoj strani molekule i  $\alpha/\beta$  domene na drugoj. U središtu enzima, na lijevom rubu peterolančanog  $\beta$ -lista, je aktivno mjesto enzima sa serinskim ostatkom na amino kraju središnjeg  $\alpha$ -heliksa. Ono se sastoji od R1 mjesta, gdje je bočni lanac R1  $\beta$ -laktamske jezgre, i R2 mjesta s bočnim lancem R2. Mjesto R1 omeđeno je  $\Omega$ -petljom, dok je mjesto R2 okruženo petljom R2 koja sadrži spirale H-10 i H-11 (9).

Struktura ABL slična je strukturi  $\beta$ -laktamaza klase A, ali je mjesto vezivanja otvorenije, pa lakše ostvaruju interakciju s velikim bočnim lancima cefalosporina.

### 1.2.4. Regulacija AmpC $\beta$ -laktamaza

Jedna od osobitosti AmpC  $\beta$ -laktamaza je promjenjiva i učinkovita ekspresija gena za ovaj enzim, prisutnog na kromosomu ili stečenog putem plazmida, ovisno o izloženosti  $\beta$ -

laktamu. Po definiciji, takva inducibilna ekspresija je reverzibilna i prestaje nakon uklanjanja induktora. Međutim, tijekom procesa mogu se izdvojiti mutante u kojima je došlo do derepresije, odnosno stalno prisutne (konstitutivne) ekspresije zbog mutacije regulatornih gena (9).

Gen za ABL intrinzično je prisutan na kromosomu nekih klinički značajnih gram-negativnih patogena. Među enterobakterijama, posebno se ističe tzv. ESCPM skupina, akronim koji označava sljedeće vrste: *Enterobacter* (*Enterobacter cloacae* complex, *Enterobacter aerogenes*), *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* i *Morganella morganii*. Ekspresija kromosomski kodirane ABL je uobičajeno niska, ali inducibilna (9).

Mehanizam indukcije je složen. Beta-laktamski antibiotik dovodi do poremećaja sinteze peptidoglikana, s posljedičnim nakupljanjem određenih oligopeptida, koji se razgrađuju do razine tri-, tetra- i pentapeptida 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramske kiseline. Oni se natječu s oligopeptidima UDP-*N*-acetilmuramske kiseline za vezno mjesto na AmpR (transkripcijski regulator LysR-tipa). Istiskivanje UDP-*N*-acetilmuramske kiseline signalizira konformacijsku promjenu u AmpR, koja aktivira transkripciju *ampC* gena (9).

Bakterije posjeduju i enzim AmpD, citoplazmatsku *N*-acetil-muramil-1-alanin amidazu, koja uklanja spomenutu 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramsku kiselinu i njene preteče nastale zbog poremećaja sinteze peptidoglikana, a smanjivanjem njihove koncentracije sprječava se prekomjerna ekspresija *ampC* gena (9).

Jedan od uzroka prekomjerne ekspresije *ampC* gena u kliničkim izolatima je mutacija u *ampD* genu, koja dovodi do hiperinducibilnosti ili konstitutivne hiperprodukcije AmpC enzima. Mutacije *ampR* gena također mogu rezultirati hiperinducibilnim ili visokokonstitutivnim fenotipovima, dok su mutacije u *ampG* genu najrjeđe i dovode do ekspresije niske razine. AmpG je permeaza unutarnje membrane koja prebacuje oligopeptide, nastale recikliranjem stanične stijenke, u citosol bakterijske stanice (9).

### 1.2.5. Indukcijske sposobnosti $\beta$ -Laktama na ekspresiju *bla*<sub>AmpC</sub> gena

Inducibilna ekspresija koja se javlja kao odgovor na izloženost  $\beta$ -laktamu, čini ovaj mehanizam rezistencije klinički značajnim jer izravno utječe na smanjenje učinkovitosti određene antimikrobne terapije.

Na temelju međusobnog odnosa sposobnosti indukcije ekspresije ABL i podložnosti hidrolizi od strane induciranog enzima,  $\beta$ -laktami se mogu podijeliti u sljedeće skupine:

a) *Jaki induktori/labilni  $\beta$ -laktami*: u toj skupini su aminopenicilini, cefalosporini prve generacije, cefoksitin i cefotetan. Ovi lijekovi induciraju ekspresiju ABL, te su ujedno i inaktivirani od strane enzima.

b) *Jaki induktori/stabilni  $\beta$ -laktami*: tipičan primjer su karbapenemi, koji su jaki induktori ekspresije ABL, ali su općenito stabilni. Sojevi koji luče ABL bilo inducibilno ili konstitutivno obično su osjetljivi na karbapeneme, osim u slučajevima stjecanja alternativnih mehanizama otpornosti na karbapeneme.

c) *Slabi induktori/labilni  $\beta$ -laktami*: u tu skupinu pripadaju ureidopenicilini (npr. piperacilin), cefalosporini treće generacije i aztreonam. U ovom slučaju, sojevi s inducibilnom ABL obično su osjetljivi na ove antibiotike, ali oni s konstitutivnom ekspresijom budu otporni. Budući da se uporabom ovih antibiotika lako izdvajaju mutirani sojevi s konstitutivnim lučenjem ABL, njihovu uporabu treba razmotriti kritički i s oprezom u liječenju infekcija uzrokovanih sojevima u kojih se očekuje indukcija *ampC* gena, čak i u slučaju očite *in vitro* osjetljivosti. Sličan oprez mogao bi se primijeniti i na piperacilin-tazobaktam, kojemu je *in vitro* osjetljivost često očuvana, budući da su i piperacilin i tazobaktam slabi induktori, međutim piperacilin je pogodan supstrat za ABL, i obično je slabo inhibiran tazobaktamom.

d) *Slabi induktori/stabilni  $\beta$ -laktami*: u tu kombinaciju pripadaju cefpirom i cefepim (cefalosporini četvrte generacije). Oni slabo induciraju ABL i obično zadržavaju svoju djelotvornost, osim u slučaju hiperprodukcije ABL ili prisutnosti varijanti AmpC enzima koje pokazuju povećanu aktivnost protiv cefalosporina četvrte generacije (9, 42, 43).

Neki inhibitori  $\beta$ -laktamaze poput klavulanske kiseline također mogu inducirati ABL. Budući da je njezin inhibicijski učinak na ovaj tip enzima zanemariv, svojom prisutnosti može paradoksalno dovesti do poništavanja učinka  $\beta$ -laktama (primjerice kombinacija tikarcilina i klavulanske kiseline u liječenju infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa*) (44).

### 1.2.6. AmpC $\beta$ -laktamaze posredovane plazmidom

AmpC  $\beta$ -laktamaze posredovane plazmidom poznate su od 1989. godine. Postoji nekoliko linija *ampC* gena posredovanih plazmidom koje vuku porijeklo iz kromosomskih *ampC* gena nekoliko različitih vrsta bakterija. Prema porijeklu, pripadaju skupinama *Enterobacter* (MIR, ACT), *Citrobacter freundii* (CMY-2-like, LAT, CFE), *Morganella morganii* (DHA), *Hafnia alvei* (ACC) i *Aeromonas* (CMY-1-like, FOX, MOX) (9, 44). Najrašireniji su CMY-2-slični enzimi, koji su otkriveni diljem svijeta u izolatima *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis* i *Salmonella enterica* (45).

Plazmidne ABL se obično konstitutivno izražavaju, budući da im nedostaje genetska podloga za regulaciju izražavanja, i najčešće uzrokuju otpornost na antimikrobne lijekove sličan onome u izolatima s derepresiranom kromosomskom ABL. Izuzetak su neke plazmidne ABL poput DHA-1, koje se mogu inducirati  $\beta$ -laktamima i imaju ekspresiju reguliranu na sličan način kao kromosomske ABL (9, 45).

### 1.2.7. Genetički elementi uključeni u mobilizaciju gena za AmpC $\beta$ -laktamazu

Različiti genetički elementi mogu biti uključeni u mobilizaciju *ampC* gena na plazmid. Pronađena je veza između insercijskog elementa *ISEcp1* (ili njegovih skraćениh verzija) i *bla<sub>CMY</sub>*, kao i nekih drugih *bla* gena (9, 46-49). Za sada je poznato da *ISEcp1* ima dvostruku ulogu: uključen je u transpoziciju susjednih gena (47) te može mobilizirati kromosomski *bla* gen na plazmid (48), a također može osigurati učinkovitu promociju visoke razine ekspresije susjednih gena (49).

Ostali elementi povezani s mogućom mobilizacijom *bla<sub>AmpC</sub>* gena su *ISCR1* *IS26*, te neki drugi (50, 51).

### 1.2.8. Hiperprodukcija AmpC $\beta$ -laktamaze

Hiperprodukcija ABL je povezana s različitim mutacijama u strateškim dijelovima promotora *ampC* gena, što dovodi do povećanja stope transkripcije, i posljedično stvaranja



većih količina enzima i visoke razine otpornosti na brojne  $\beta$ -laktame. Dokazano je povećanje ekspresije *bla<sub>ampC</sub>* gena od čak 8–280 puta, ovisno o različitim mutacijama u promotorima (52). Također, studija koja je proučavala inducibilnost *bla<sub>CMY-7</sub>* gena u kliničkom izolatu *Salmonella typhimurium* pokazala je da transkripcija CMY-7 enzima u tom izolatu počinje unutar *ISEcp1* elementa i odvija se na značajno višoj razini od ekspresije odgovarajućeg gena u *C. freundii* (49).

Kako je već spomenuto u odjeljku o regulaciji ABL, prekomjerna ekspresija AmpC enzima može nastati zbog promjena u *ampD* ili *ampR* genu. Zabilježene su promjene u *ampR* genu nastale zbog neuspjeha u prijenosu *ampR* gena, kao i zbog stečenog *ISEcp1* elementa koji se umetnuo na AmpR-vezno mjesto uzvodno od *bla<sub>AmpC</sub>* gena i time osigurao promicanje visoke ekspresije *bla* gena (47-49).

### 1.2.9. AmpC cefalosporinaze proširenog spektra (ESACs)

Različiti genetski događaji u gram negativnim bakterijama mogu dovesti do povećanog spektra djelovanja ABL, koja može zahvatiti čak i cefepim i cefpirom. Evolucija takve rezistencije dovela je do pojave novog naziva: AmpC cefalosporinaza proširenog spektra (*engl. extended-spectrum AmpC cephalosporinase*; ESAC) (53).

ESAC pokazuje povećanu katalitičku učinkovitost protiv cefalosporina proširenog spektra zbog strukturne modifikacije u blizini aktivnog mjesta enzima, i najčešće je posljedica missense mutacija koje dovode do supstitucija aminokiselina, sa strukturnim modifikacijama na veznim mjestima R1 (na  $\Omega$ -petlji) ili R2 (na spirali H10) (45). Također su uočene insercije i duplikacije, ili kombinacije navedenih promjena (45).

Neke izmjene na *bla<sub>AmpC</sub>* genima su uspjele čak utjecati na osjetljivost na novije kombinacije  $\beta$ -laktama i inhibitora  $\beta$ -laktamaze, primjerice delecija dvije aminokiseline na R2 mjestu AmpC enzima u *E. cloacae* dovela je do smanjene osjetljivosti na ceftazidim-avibaktam i cefiderokol (54).

### 1.2.10. Dokazivanje AmpC $\beta$ -laktamaza

Prema smjernicama za detekciju mehanizama otpornosti bakterija Europskog povjerenstva za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST), fenotipska otpornost na cefoksitin, određena prema preporučenim graničnim vrijednostima osjetljivosti, u kombinaciji s fenotipskom otpornosti na ceftazidim i/ili cefotaksim, mogu se koristiti kao fenotipski probir u detekciji lučenja stečene ABL (55). Očuvana osjetljivost na cefepim i neosjetljivost na inhibiciju klavulanskom kiselinom dodatni su kriteriji koji potvrđuju mogućnost lučenja ABL. Ipak, ovakav probir neće otkriti ACC-1, plazmidnu ABL koji ne hidrolizira cefoksitin (55). Također, otpornost na cefoksitin može biti i posljedica nedostatka porina (9).

Hipoteza o lučenju ABL mora se potvrditi dodatnim fenotipskim i genotipskim testovima. Fenotipski testovi potvrde se temelje na inhibiciji ABL ili kloksacilinom ili derivatima boronične kiseline. Treba voditi računa da derivati boronične kiseline također inhibiraju karbapenemazu klase A, kao i neke penicilinaze klase A (55).

U slučaju *E. coli*, ovi potvrdni testovi ne mogu razlikovati radi li se o stečenoj ABL ili konstitutivnoj hiperprodukciji kromosomske ABL, te bi se takvo pitanje trebalo razlučiti molekularnim metodama (55).

Istovremeno lučenje ESBL i ABL u nekim sojevima čini tumačenje antibiograma još izazovnijim. Fenotipski testovi za detekciju ESBL mogu dati lažno negativne rezultate zbog visoke razine ekspresije ABL, što maskira prisutnost ESBL (55). Tada se preporučuje provesti ESBL probir s cefepimom kao indikatorom za ESBL (stabilan na ABL) ili uključiti korištenje kloksacilina kao inhibitora AmpC enzima, kao dodatak diskovima za detekciju ESBL ili dodatak agaru na kojem se vrši testiranje (55).

Već je spomenuto kako hiperprodukcija ABL ili smanjena propusnost vanjske membrane zbog mutacija porina mogu smanjiti osjetljivost na karbapeneme, dajući obrasce otpornosti slične onima s lučenjem karbapenemaza, i takve situacije također treba razlikovati. One se jasno mogu razlučiti samo genotipskim metodama.

### **1.2.11. Uloga molekularne epidemiologije u praćenju širenja višestruko otpornih enterobakterija**

Antimikrobna otpornost bakterija je vrlo ozbiljan problem globalnog zdravlja koji dovodi do porasta morbiditeta i mortaliteta, a komplikacije liječenja odražavaju se na dužinu boravka u bolnici i troškove zdravstvene skrbi (56). Molekularna analiza epidemiologije i mogućih mehanizama otpornosti važan je korak u planiranju strategija borbe protiv takvih prijetnji, kao što su adekvatne mjere kontrole bolničkih infekcija i učinkovito upravljanje antimikrobnim lijekovima (engl. *antimicrobial stewardship*).

Neki klonovi određene bakterijske vrste imaju veći epidemijski potencijal od drugih, i to se može procijeniti prema njihovoj prevalenciji (57). Postoji više različitih molekularnih metoda koje se mogu koristiti za epidemiološke i druge analize u svrhu genotipizacije, od kojih je jedna od značajnijih gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*; PFGE). To je najčešća metoda kojom se identificiraju epidemijski klonovi u ustanovama povezanim sa zdravstvenom skrbi. Postupak započinje digestijom deoksiribonukleinske kiseline (DNK) restriksijskim enzimima, čime se dobiju restriksijski odsječci DNK koji se razdvajaju gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju. Uzorak DNK odsječaka u gelu nakon izlaganja električnoj struji jedinstven je za svaki bakterijski soj i podtip, i može se koristiti u daljnjoj analizi genetičke srodnosti analiziranih izolata (58). Klonske kategorije, odnosno PFGE skupine definiraju se prema naputcima i kriterijima iznesenim u studiji Tenover i suradnika iz 1995. godine (59).

### **1.2.12. Liječenje infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče AmpC $\beta$ -laktamaze**

Liječenje ozbiljnih infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ABL je izazovno, jer početna *in vitro* osjetljivost na antimikrobne lijekove dobivena u laboratoriju možda neće predvidjeti kliničku učinkovitost. Kao što je spomenuto, izloženost  $\beta$ -laktamskim antibioticima može odabrati derepresirane varijante, koje zbog mutacije u regulatornim genima mogu izražavati visoke razine ABL (9). Uz to, različite vrste mogu izraziti ili ne izraziti gen otpornosti, a različiti antimikrobni lijekovi imaju različitu učinkovitost indukcije ekspresije istog (9,42). Kliničke studije koje procjenjuju učinkovitost liječenja infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL trenutno su rijetke, a većina dokaza temelji se

na retrospektivnim podacima. Tumačenje dobivenih rezultata dodatno je komplicirano heterogenošću različitih studija, jer primjerice neke uključuju samo jedan rod bakterije (npr. *Enterobacter* spp.) dok druge istražuju cijelu ESCPM skupinu, ili se neke fokusiraju samo na izolate koje luče enzim inducibilno, dok su druge orijentirane na one s konstitutivnim lučenjem (60-62). Također, neke uključuju samo izolate iz krvi, dok druge uključuju i izolate iz raznih drugih uzoraka, što odražava vrlo različite kliničke situacije (60-62).

Općenito se smatra da cefalosporine treće generacije treba izbjegavati u liječenju ovakvih infekcija bez obzira na *in vitro* osjetljivost, zbog značajnog rizika od pojave rezistencije tijekom liječenja (9, 42, 43, 63). Karbapenemi se obično smatraju opcijom prvog izbora, ali zabrinjavajući porast otpornosti bakterija na karbapeneme u svijetu naglašava važnost alternativnih izbora liječenja ovakvih infekcija. Osim stjecanja gena za karbapenemaze, fenotip smanjene osjetljivosti na karbapeneme može biti posredovan i prekomjernim lučenjem ABL uz gubitak porina vanjske membrane, i prema trenutnim saznanjima ne postoji klinička studija o najprikladnijem liječenju ovakvih situacija. Stoga je važno definirati terapijske opcije koje bi bile prikladna zamjena za karbapeneme.

Jedan od potencijalnih zamjenskih lijekova je piperacilin/tazobaktam. Tazobaktam je slab induktor i slab inhibitor ABL, ali ipak ponekad može biti učinkovit u kombinacijama kao što je s piperacilinom (9, 43). U starijim studijama nije pokazao inferiornost u odnosu na karbapeneme u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama s kromosomskom inducibilnom ABL (64, 65), ali je u novijim njegova uloga diskutabilna (66-69). Osim toga, nema dovoljno studija koje pokazuju njegovu kliničku učinkovitost na sojevima sa stečenom i konstitutivno izraženom ekspresijom ili hiperekspresijom ABL. Stoga ovu opciju liječenja treba razmotriti s oprezom dok se ne provedu dodatna istraživanja (42).

Cefepim se također nije pokazao inferiornim u usporedbi s karbapenemima u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama s kromosomskom ABL (64, 70), ali se pokazalo da je njegova učinkovitost pouzdana samo za sojeve koji imaju minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK)  $\leq 2\text{mg/L}$ , jer se u liječenju sojeva s većim vrijednostima MIK-a pokazao inferiornim (61). Uz to, njegova učinkovitost značajno ovisi i o inokulumu bakterija na mjestu infekcije (61, 71). Stoga Britansko društvo za antimikrobnu kemoterapiju (engl. *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*; BSAC) u svojim smjernicama preporučuje uporabu cefepima u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ESBL ili ABL samo

ako im je minimalna inhibitorna koncentracija čak  $\leq 1$  mg/L, i to na optimiziran način primjene (produljena infuzija), i strogo je protiv uporabe ako je MIK 2–4 mg/L, iako se prema smjernicama EUCAST-a te vrijednosti interpretiraju kao osjetljivost ovisna o dozi. Također je strogo protiv uporabe ako postoji istovremeno lučenje ESBL i ABL (63, 72). Snažno preporučuju uporabu meropenema, imipenema ili ertapenema u liječenju ozbiljnih infekcija enterobakterijama koje luče ABL.

Budući da je opseg u kojem se piperacilin/tazobaktam može koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL još uvijek dosta neodređen, a uporaba cefepima ima spomenuta ograničenja, kao potencijalne alternative karbapenemima razmatraju se, među ostalim, nove kombinacije  $\beta$ -laktama i inhibitora  $\beta$ -laktamaza.

Ceftolozan/tazobaktam je antipseudomonasna kombinacija  $\beta$ -laktama i inhibitora  $\beta$ -laktamaze novijeg datuma, koja je pokazala varijabilnu aktivnost protiv enterobakterija koje luče ABL, pogotovo u slučaju hiperprodukcije enzima (73, 74). Također, izolati *Enterobacter* spp. koji imaju derepresiju *bla*<sub>AmpC</sub> gena pokazali su se često otpornima (73, 74). Stoga je uporaba ovog antibiotika ne preporučuje u liječenju infekcija enterobakterijama koje luče ABL (63).

Nasuprot tome, ceftazidim/avibaktam sadrži novi inhibitor  $\beta$ -laktamaze strukturno različit od drugih do sada korištenih inhibitora (inhibitori novije generacije koji se ne temelje na  $\beta$ -laktamu), i široko je aktivan protiv enterobakterija s AmpC enzimima, te se čini dobrom alternativom karbapenemima u liječenju infekcija uzrokovanih takvim sojevima (63, 75). Na žalost, posljednjih godina opisane su CMY varijante ABL koje dovode do otpornosti na ceftazidim-avibaktam u enterobakterija (76, 77).

Moguća alternativa karbapenemima je i temocilin, 6- $\alpha$ -metoksi derivat tikarcilina, davno korišteni antibiotik koji je ponovo uveden u primjenu zbog mikrobiološke i kliničke djelotvornosti protiv enterobakterija koje luče ESBL i/ili derepresiranu ABL, i mogao bi se koristiti kao učinkovita alternativa uskog spektra, ali je za sada registriran samo u nekim europskim zemljama (Belgija, Velika Britanija, Njemačka, Francuska i Luksemburg) i samo za neke indikacije (41, 78, 79).

Fosfomicin je također ne tako davno vraćen u uporabu, te je dostupan u oralnom obliku za liječenje nekomplikiranih mokraćnih infekcija, a intravenski za kombinirano liječenje

infekcija različitih lokacija, jer u tom obliku ima povoljnu farmakokinetiku i distribuciju u razna tkiva i organe (80). Iako je pokazao aktivnost protiv MDR bakterija, ipak nema dovoljno studija o učinkovitosti liječenja infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama koje luče ABL (80, 81).

Zaključno, do sada se najviše dokaza iz literature o učinkovitom liječenju može naći za karbapeneme i cefepim, ali za potonji ovisno o vrijednostima MIK-a i drugim ograničavajućim čimbenicima. Također, pri izboru odgovarajućeg antimikrobnog lijeka važno je imati na umu ozbiljnost i mjesto infekcije, prethodnu uporabu antimikrobnih lijekova za koje je poznato da su induktori, te razinu ekspresije ABL. Stoga su neophodne daljnje, dobro provedene studije koje će razjasniti nejasnoće o najprikladnijem liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL, pogotovo ako je ono praćeno derepresijom i/ili visokom ekspresijom gena.

### 1.3. AmpC $\beta$ -laktamaze u vrsti *Proteus mirabilis*

Početak 2000-tih, svugdje u svijetu je dominantan način stečene otpornosti na  $\beta$ -laktamske antibiotike u vrsti *P. mirabilis* bila ESBL, te je ista opisana i u KBC Split (10, 11, 82). Međutim, narednih godina sve se više prijavljuju plazmidom posredovane cefalosporinaze u enterobakterijama. Gen za *bla*<sub>AmpC</sub>, kojeg *P. mirabilis* izvorno nema, prvi put je prijavljen u ovoj vrsti 1998. godine u Francuskoj (84) i od tada je opisan u mnogim zemljama (25, 84-89). Najčešće je opisan CMY/LAT tip, čiji su geni najvjerojatnije dospjeli u *P. mirabilis* horizontalnim prijenosom s kromosoma vrste *C. freundii*.

Neki od europskih sojeva *P. mirabilis* koji luče različite CMY varijante ABL pokazali su značajnu srodnost, što ukazuje na mogućnost zajedničkog podrijetla od pretka sa stečenim i kromosomski umetnutim *bla*<sub>CMY</sub> genom, što je onda dalje bilo praćeno klonskim širenjem, ali i kontinuiranom diverzifikacijom zbog mutacija (89).

Distribucija CMY varijanti u vrsti *P. mirabilis* razlikuje se od zemlje do zemlje. Primjerice, u Poljskoj su opisane varijante CMY-4, CMY-12, CMY-14, CMY-15, CMY-38 i CMY-45, dok se CMY-16 opisuje u Grčkoj i Italiji (84, 86, 88-90). U Bugarskoj su 2011. godine otkrivena tri izolata koja su istovremeno lučili VIM-1 i CMY-99, a slijedeće godine se pojavila epidemija spomenutog klona (25, 91). Inače, CMY-99 je ABL koja je blisko povezana s CMY-16, i od nje se razlikuje samo u jednoj aminokiselini (91).

Insercijska sekvenca (IS) *ISEcp1* često je opisivana uzvodno i blizu *bla*<sub>CMY</sub> gena, kao i neke druge IS. One su vjerojatno povezane s transpozicijom i integracijom navedenih gena u kromosom (84, 86, 88-90, 92). U transpozicijskom modulu nazvanom Tn6093, *ISEcp1* nalazi se 110-bp uzvodno od *bla*<sub>CMY</sub> gena i sadrži fragmente kromosoma *C. freundii* na plazmidu tipa *ColE1* (89). Kao što je već spomenuto, IS također može biti povezana s promotorskom regijom i sudjelovati u visokoj razini ekspresije nizvodnog *bla*<sub>CMY</sub> ili nekih drugih susjednih *bla* gena (46, 49, 93).

U značajnije manjem broju opisani su neki drugi tipovi ABL u *P. mirabilis*, primjerice DHA-1, FOX i ACC-1 enzimi.

DHA-1 je inducibilna cefalosporinaza prisutna na kromosomu *M. morgani*, a prvi put je prijavljena u izolatima *P. mirabilis* u Francuskoj i Koreji 2005. godine (94, 95).

Cefalosporinaza tipa FOX ima nešto drugačiju proteinsku sekvencu i najviše je rasprostranjena u enterobakterijama u Sjedinjenim Državama, gdje je jednom opisana i u vrsti *P. mirabilis* kao varijanta FOX-5 (82). ACC-1 je također plazmidom prenosiva cefalosporinaza, koja vuče porijeklo iz vrste *Hafnia alvei* i koja je specifična po tome što ne hidrolizira cefoksitin (96). Nađena je među izolatima *P. mirabilis* u Francuskoj, Španjolskoj i Tunisu (87, 96, 97).

Do objave rada koji je dio ove doktorske disertacije, u Hrvatskoj nisu bili opisani klinički izolati vrste *P. mirabilis* koji luče ABL.



#### **1.4. Primjerenost empirijskog antimikrobnog liječenja infekcija uzrokovanih višestruko otpornim izolatima vrste *Proteus mirabilis* koji luče AmpC $\beta$ -laktamazu**

Pojava plazmidom posredovanih cefalosporinaza u vrstama koje ih intrinzično nemaju, povećala je neizvjesnost u izboru prikladnog empirijskog liječenja infekcija uzrokovanih enterobakterijama. Uz to, za razliku od intrinzičnih, stečene ABL obično su izražene konstitutivno (9). Ovakvo konstitutivno lučenje ABL, pogotovo kad je udruženo s ostalim mehanizmima rezistencije koji su često prisutni u bolničkim sojevima, ostavlja sužen izbor učinkovitih antimikrobnih lijekova i predstavlja ozbiljan klinički problem. Spomenuto je da su kolistin i tigeciklin lijekovi na koje je *P. mirabilis* intrinzično otporan, a često su zadnji izbor u liječenju infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama. Također, već su opisani izolati *P. mirabilis* s istovremenim lučenjem ABL i karbapenemaze, što drastično smanjuje terapijski izbor. Na žalost, već su opisani i sojevi s rezistencijom na antimikrobne lijekove novijeg datuma usmjerene na liječenje sojeva rezistentnih na karbapeneme (25,76, 77, 88).

Karbapenemi se obično smatraju lijekom izbora u liječenju infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama koje luče ABL (9, 42, 63, 68), ali je poželjno 'poštedjeti' uporabu karbapenema i ograničiti selekcijski pritisak koji vodi do pojave otpornosti na karbapeneme u gram-negativnih bakterija. Još uvijek nema dovoljno studija koje pružaju dokaze o sigurnom izboru alternativnog lijeka u empirijskoj ili konačnoj terapiji MDR enterobakterija koje luče ABL.

Empirijsko i konačno antimikrobno liječenje MDR izolata *P. mirabilis* značajan je terapijski izazov, a ispravna i pravovremena karakterizacija tipa rezistencije važan preduvjet za izbor učinkovitog antimikrobnog lijeka. Početna antibiotska terapija mora biti primjerena i pravodobna, pogotovo u liječenju teških infekcija poput sepse (98). Više različitih studija pokazalo je da postoji jaka povezanost između neprimjerene i/ili odgođene antibiotske terapije sepse te smrtnosti, kao i dužine bolničkog liječenja (98-100).

Izbor empirijske antibiotske terapije određuje se procjenom ozbiljnosti bolesti i mogućeg uzročnika na temelju epidemioloških i kliničkih čimbenika i čimbenika rizika

domaćina, te vjerojatnosti višestruke otpornosti uzročnika (98). Iznimno je važno pružiti brzu i točnu informaciju o prisutnosti specifičnih mehanizama rezistencije, njihovom širenju i osjetljivosti takvih sojeva na antimikrobne lijekove, ne samo zbog primjerenog izbora liječenja već i planiranja mjera kontrole bolničkih infekcija.

Prema dosadašnjim spoznajama, još uvijek nema objavljene studije koja se bavi pitanjem empirijskog liječenja infekcija uzrokovanih MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL.

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## Hipoteze

- U višestruko otpornim izolatima vrste *P. mirabilis*, prikupljenim iz kliničkih uzoraka u KBC Split,  $\beta$ -laktamska rezistencija je posljedica konstitutivnog lučenja AmpC  $\beta$ -laktamaze.
- Gen *bla*<sub>AmpC</sub>, koji je stečen plazmidom, ugrađen je u kromosom uz dodatne genske izmjene na kromosomu koje su povezane s konstitutivnom ekspresijom.
- Prikupljeni izolati su klonski srodni, pa se stečena antimikrobna rezistencija širi dalje vertikalnim klonskim prijenosom.
- Određeni antimikrobni lijekovi imaju bolju učinkovitost protiv višestruko otpornih izolata *P. mirabilis* koji luče AmpC  $\beta$ -laktamazu.
- Postoje određeni rizični čimbenici koji pogoduju nastanku sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče AmpC  $\beta$ -laktamazu.
- Postoji veća vjerojatnost neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče AmpC  $\beta$ -laktamazu.

## Ciljevi istraživanja

- Dokazati lučenje AmpC β-laktamaze u dovoljnom broju višestruko otpornih kliničkih izolata *P. mirabilis* ( $n \geq 100$ ), korištenjem fenotipskih testova za detekciju mehanizama rezistencije.
- Detektirati prisutnost gena koji kodira AmpC β-laktamazu molekularnim metodama, odrediti sekvencije nukleotida gena i definirati tip AmpC β-laktamaze.
- Utvrditi smještaj *bla*<sub>AmpC</sub> gena na kromosomu, te detektirati prisutnost insercijskog elementa povezanog s ugradnjom gena u kromosom i konstitutivnom ekspresijom.
- Utvrditi genotipizacijom epidemiološku srodnost izolata prikupljenih na različitim bolničkih klinikama i odjelima.
- Odrediti osjetljivost izolata na sve antimikrobne lijekove koji se rutinski testiraju za enterobakterije, te odrediti minimalne inhibitorne koncentracije za one antimikrobne lijekove na koje postoji osjetljivost ili umjerena osjetljivost dobivena metodom disk difuzije, te dodatnih antimikrobnih lijekova koji nisu testirani, a za koje se pretpostavlja da bi mogli biti učinkoviti, a to su: ceftazidim/avibaktam, ceftolozan/tazobaktam, temocilin i fosfomicin.
- Ispitati postoji li povezanost određenih demografskih, epidemioloških i kliničkih podataka pacijenata s pojavom sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče AmpC β-laktamazu, u usporedbi s kontrolnom skupinom (sepse uzrokovane osjetljivim izolatima *P. mirabilis* koji ne luče AmpC β-laktamazu).
- Ispitati postoji li povezanost između sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče AmpC β-laktamazu i neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja, u usporedbi s kontrolnom skupinom (sepse uzrokovane osjetljivim izolatima *P. mirabilis* koji ne luče AmpC β-laktamazu).
- Utvrditi antimikrobni lijek s najvećom vjerojatnosti mikrobiološke eradikacije u hemokulturama pacijenata sa sepsom uzrokovanom višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče AmpC β-laktamazu, u usporedbi s kontrolnom skupinom.

### **3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA**

### 3.1. Ustroj istraživanja

Prema namjeni radi se o temeljnom istraživanju. Prema specifičnom ustroju, radi se o opažajnom (opservacijskom) istraživanju.

Prvi dio istraživanja je presječno istraživanje. Jedinice analize su konsektivno prikupljeni bakterijski izolati bolničkih pacijenata s dokazanom infekcijom, kojima se istraživala genetska podloga  $\beta$ -laktamske rezistencije, epidemiološka srodnost i osjetljivost na antimikrobne lijekove. Jedinice analize su se probirale prema kliničkim podacima pacijenata i specifičnoj osjetljivosti na antimikrobne lijekove uočenoj u rutinskom radu.

Drugi dio istraživanja je usmjeren na povezanost određenih rizičnih čimbenika s pojavom sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, te povezanost sepse uzrokovane takvim izolatima s neprimjerenim empirijskim antimikrobnim liječenjem. Jedinice istraživanja su pacijenti sa sepsom koju uzrokuje *P. mirabilis*, prikupljeni iz laboratorijskog informatičkog sustava u razdoblju od 2019.-2023. godine. Oni su podijeljeni na skupinu slučajeva (one kojima je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* koji luči ABL), i skupinu kontrola (uzročnik sepse je osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči ABL). Demografski, epidemiološki i klinički podatci pacijenata retrospektivno su prikupljeni iz njihove medicinske dokumentacije.

## 3.2. Materijali istraživanja

### 3.2.1. Bakterijski izolati uključeni u studiju

Istražena je zbirka od stotinu MDR izolata *P. mirabilis*, prikupljenih konsektivno iz klinički značajnih različitih uzoraka bolesnika liječenih na različitim klinikama i odjelima u KBC Split, a koji su u rutinskom laboratorijskom radu pokazali isti profil antimikrobne osjetljivosti određen metodom disk-difuzije i interpretiran prema smjernicama EUCAST-a (102). Uzorak se prikupljao sustavno, ali sa slučajno izabranim početkom prikupljanja.

Kriteriji uključenja su bili klinička značajnost uzorka (bolnički pacijenti s dokazanom infekcijom), i profil antimikrobne osjetljivosti koji je uključivao višestruku otpornost na različite skupine antimikrobnih lijekova, uz obavezno prisutne otpornosti na amoksicilin/klavulansku kiselinu i cefoksitin kao znakove sumnje na prisutnost ABL. Definicija višestruke otpornosti je otpornost izolata na barem jedan antimikrobni lijek iz skupine, u najmanje tri različite skupine antibiotika. Kriterij isključenja je ponavljajući (copy) soj (isti soj od istog bolesnika s istom antimikrobnom osjetljivošću, izoliran tijekom 30 dana).

### 3.2.2. Klinički podatci ispitanika uključenih u studiju

Izdvojen je popis svih bolesnika koji su bolovali od sepse kojoj je uzročnik bio *P. mirabilis*, u periodu koji je dostupan laboratorijskom informacijskom sustavu (2019-2023).

Kriteriji uključenja su bolesnici stariji od 18 godina, koji su liječeni u KBC Split, s jasno dokazanom sepsom koju uzrokuje *P. mirabilis* (pozitivna hemokultura uz kliničke znakove sepse). Kriterij isključenja su bolesnici kojima je *P. mirabilis* izoliran iz hemokulture kao dio polimikrobne infekcije.

Ispitanici su potom podijeljeni u dvije skupine, skupinu slučajeva kojima je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* koji luči ABL, i skupinu kontrola kojima je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči ABL. Lučenje ABL definirano je na temelju karakterističnog profila antimikrobne otpornosti i pozitivnih fenotipskih testova (ovaj dio je slijedio nakon prvog dijela istraživanja,



u kojem je već potvrđena prisutnost gena za ABL u istovrsnom fenotipskom profilu). Omjer slučajeva i kontrola je 1:1, a kriteriji podudaranja su spol i dob ( $\pm 5$  godina).

Minimalna veličina uzorka za ovaj dio istraživanja izračunata je na temelju njegovog glavnog ishoda, a to je neprimjerenost propisanog empirijskog antibiotika u liječenju sepse uzrokovane MDR sojem *P. mirabilis*, uz graničnu vrijednost  $p$  od 5% i snagu istraživanja od 80%. Primjerenost se definira kao usklađenost terapije primijenjene tijekom prvih 24 h s antimikrobnom osjetljivošću izolata dobivenom u mikrobiološkom laboratoriju. Varijabilnost parametra procijenjena je iz literature.

U izračunu veličine uzorka korišten je računalni program (mrežna stranica <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>), te je određen minimalan potreban uzorak od 72 ispitanika po svakoj skupini, odnosno sveukupno 144 ispitanika (102).

Pregledom medicinske dokumentacije bolesnika i korištenjem obrasca za prikupljanje medicinskih podataka, prikupljeni su demografski, epidemiološki i klinički podatci pacijenata (obrazac u privitku). U pacijenata s više pozitivnih hemokultura tijekom istog kliničkog slučaja sepse, uzimali su se samo podatci vezani uz prvu pozitivnu hemokulturu.

Prikupljeni su sljedeći podatci: dob, spol, dolazak bolesnika na hospitalizaciju iz vlastitog doma, staračkog doma ili druge zdravstvene ustanove, prijemna i glavna dijagnoza, primarni izvor infekcije ukoliko je poznat, druga zdravstvena stanja koja uključuju teži oblik COVID-19 infekcije (s hospitalizacijom) u trenutku prijema ili u prethodna 3 mjeseca, onkološke bolesti, bolesti koje su zahtijevale kortikosteroidnu terapiju u prethodna 3 mjeseca, druga imunokompromitirajuća stanja, te tešku traumu, potom antimikrobna terapija ukoliko je primijenjena u prethodna 3 mjeseca i koja je trajala  $\geq 48$  h, hospitalizacija tijekom prethodnih 12 mjeseci i koja je trajala  $\geq 48$  h, kirurški zahvati neposredno povezani s infekcijom, invazivni zahvati provedeni u prethodnih 30 dana od početka sepse, datum pojave sepse, dužina hospitalizacije do trenutka pojave sepse, primijenjena empirijska antimikrobna terapija u trenutku pojave sepse, da li je empirijska terapija bila usklađena s mikrobiološkim nalazom, konačna antimikrobna terapija, vrijeme uvođenja primjerene antimikrobne terapije ( $\leq 24$  h ili  $> 24$  h), te ishodi sepse: kliničko poboljšanje ( $\leq 72$  h ili  $> 72$  h), mikrobiološka eradikacija ( $\leq 72$  h ili  $> 72$  h), smrt u razdoblju od 60 dana od pojave sepse, i dužina

hospitalizacije od pojave prve epizode sepsa (raspoređeno u tri kategorije: kratak boravak: 0–5 dana, srednje dug boravak: 6–10 dana i dug boravak: > od 10 dana).

Prikupljeni podatci pacijenata nisu spojivi s njihovim identitetom, jer su dvostruko zaštićeni laboratorijskim brojem uzorka i dodijeljenim brojem istraživanja.

### 3.3. Metode istraživanja

#### 3.3.1. Identifikacija prikupljenih bakterijskih izolata

Identifikacija bakterijskih izolata do razine vrste provedena je pomoću konvencionalnih biokemijskih metoda i automatizirane metode MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) (1, 103).

#### 3.3.2. Fenotipska karakterizacija $\beta$ -laktamske rezistencije

Za fenotipsku detekciju lučenja ESBL enzima, koristio se test sinergizma dva diska (engl. *double disk synergy test*; DDST), u kojem su diskovi s cefotaksimom, ceftriaksonom i ceftazidimom postavljeni pored diska s kombinacijom amoksicilina i klavulanske kiseline (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) na podlozi Mueller-Hinton (MH) (Merck, Darmstadt, Germany) uz dodatak 200 mg/mL kloksacilina (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), radi inhibicije AmpC enzima, te je očitano prema smjernicama (104).

Za fenotipsku detekciju lučenja ABL enzima, provodio se cefoksitin Hodge test na podlozi MH, pri čemu su korišteni disk cefoksitina (30 mg; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) i soj *Escherichia coli* ATCC 25922, po već opisanom postupku (105).

#### 3.3.3. Molekularna epidemiologija

Genetička srodnost izolata istražena je pomoću gel elektroforeze u izmjeničnom električnom polju (PFGE), na genomskoj deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) razgrađenoj *Sma*I endonukleazom, korištenjem sustava CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories) kako je ranije opisano (106). Izračun sličnosti uzoraka traka u PFGE rezultatima i grupiranje izolata u klonske kategorije provedeno je korištenjem Dice koeficijenta (tolerancija od 1,8%) i neponderane metode za sparivanje skupina s aritmetičkom sredinom (BioNumerics v7.6, Belgija).

### 3.3.4. Molekularna karakterizacija $\beta$ -laktamske rezistencije

Detekcija gena koji kodiraju ABL (*bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, i *bla*<sub>ACT</sub>) provedena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR) (89, 107). Na isti način provjerila se i prisutnost gena koji kodiraju ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, i *bla*<sub>SME</sub>) (108). Detektirani geni dalje su sekvencirani pomoću ABI310, korištenjem BigDye v1.1 tehnologije (ThermoFisher Scientific).

### 3.3.5. Lokalizacija *bla*<sub>AmpC</sub> gena i detekcija elementa *ISEcp1*

Kako bi se utvrdilo da li je gen *bla*<sub>AmpC</sub> lociran na plazmidu ili kromosomu, urađena je hibridizacija DNK metodom po Southern-u. Nakon što je DNK iz agaroznih blokova dobivenih PFGE metodom tretirana S1-nukleazom i *I*-Ceul endonukleazom (84, 109), nanosena je na pozitivno nabijenu najlonsku membranu i hibridizirana s *bla*<sub>CMY</sub>-specifičnom sondom korištenjem kompleta reagencija „DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I“ (Roche, Njemačka), prema uputama proizvođača. Također je korištena 16s rDNK-specifična hibridizacijska sonda na PFGE agaroznim blokovima tretiranim *I*-Ceul endonukleazom (84). Detekcija *ISEcp1* elementa PCR-om i sekvenciranje razmaknice između *ISEcp1* i *bla*<sub>CMY</sub> provedena je pomoću početnica ampC5 (5c'-CAG CGT TTG CTG CGT G-3c') (93) i ISECP1 (5c'-AAA AAT GAT TGA AAG GTG GT-3c') (107).

### 3.3.6. Ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Antimikrobna osjetljivost svih izolata uključenih u studiju određena je metodom disk difuzije za slijedeće antimikrobne lijekove: amoksisilin (20  $\mu$ g), amoksisilin/klavulanska kiselina (20/10  $\mu$ g), cefuroksim (30  $\mu$ g), cefotaksim (5  $\mu$ g), ceftriakson (30  $\mu$ g), ceftazidim (10  $\mu$ g), cefepim (30  $\mu$ g), ertapenem (10  $\mu$ g), imipenem (10  $\mu$ g), meropenem (10  $\mu$ g), piperacilin/tazobaktam (30/6  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75  $\mu$ g), ciprofloksacin (5  $\mu$ g) i levofloksacin (5  $\mu$ g) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Osjetljivost je testirana na MH agaru suspenzijom bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarlanda (1 McF  $\sim 10^8$  CFU/mL).

Svim izolatima dodatno je određena minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika korištenjem gradijent testa za one antimikrobne lijekove koji su pokazali određenu aktivnost metodom disk difuzije: piperacilin/tazobaktam, cefepim, imipenem, meropenem, i ertapenem, te za one koji se nisu testirali u rutinskom radu, a moguće su alternative karbapenemima: temocilin, fosfomicin, ceftazidim/avibaktam i ceftolozan/tazobaktam (Liofilchem, Roseto Degli Abruzzi, Italija, i bioMérieux, Marcy L'Etoile, France za posljednja dva navedena).

Za obje metode rezultati su interpretirani prema smjernicama EUCAST-a (101), s izuzetkom temocilina, za kojeg je rezultat interpretiran prema standardima BSAC-a (110).

### **3.3.7. Statistički postupci u obradi prikupljenih kliničkih podataka**

Za dio studije koji se odnosi na istraživanje povezanosti potencijalnih rizičnih čimbenika s pojavom sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, koristila se statistička analiza različitih ulaznih kvalitativnih varijabli (demografskih, epidemioloških i kliničkih obilježja pacijenata) u ispitnoj i kontrolnoj skupini. Izlazni parametar statističke analize je sepsa uzrokovana MDR ili osjetljivim sojem *P. mirabilis*.

Ispitna skupina je uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* koji luči ABL i nazvana je MDRPM, dok je kontrolna skupina uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči ABL, i nazvana je OPM. Postupak oblikovanja ispitne i kontrolne skupine, izračun veličine uzorka i način prikupljanja podataka detaljno su opisani u dijelu metoda istraživanja koji se odnosi na ispitanike uključene u studiju.

Provedene su slijedeće analize:

- univarijatne opisne statistike (za MDRPM i OPM skupinu te ukupno),
- bivarijatne analize (krostabulacije, testovi asocijacija i grafički prikazi), i
- logistička regresija za eksploraciju i predviđanje vjerojatnosti razvoja sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* u odnosu na sepsu uzrokovanu osjetljivim izolatima *P. mirabilis*, na osnovu demografskih, epidemioloških i kliničkih varijabli.

Za dio studije kojem je cilj bio ispitati hipotezu o većoj vjerojatnosti neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja u slučaju sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, nego u slučaju sepse uzrokovane osjetljivim izolatima koji ne luče ABL, provedena je univarijatna logistička regresijska analiza za predviđanje vjerojatnosti (i omjera rizika) neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja u prvih 24 h od nastanka sepse na osnovu tipa osjetljivosti izolata *P. mirabilis* kao jedine prediktorske varijable.

Za testiranje asocijacija primijenjeni su  $\chi^2$  ili Fisherov egzaktni test, te Cochran-Mantel-Haenszel test za testiranje asocijacija po grupama odnosno stratumima. Za izradu svih tablica i grafikona, te statističkih analiza korišten je SAS statistički softver verzije 9.4. Za statističke testove primijenjena je razina značajnosti od 5% (drugim riječima, testovi sa p-vrijednosti manjima od 0.05 smatraju se statistički značajnima). U bivarijatnim analizama testovi nisu prilagođeni na višestruko testiranje (na primjer između tipa osjetljivosti izolata *P. mirabilis* i niza kategorijskih varijabli), već je pogreška prvog reda kontrolirana za svaki test zasebno. Međutim, konačni zaključci su bazirani na rezultatima višestruke logističke regresije.

Konačno, treba napomenuti da iz rezultata ove studije nije moguće donijeti zaključke o kauzalnosti, već samo o asocijacijama i vezama između tipa osjetljivosti izolata *P. mirabilis* i izmjerenih obilježja/varijabli, budući da podaci nisu prikupljeni na osnovu randomiziranog eksperimenta, nego se radi o retrospektivnoj opservacijskoj studiji.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

## 4.1. Studijski izolati

Na temelju ranije spomenutog profila antimikrobne osjetljivosti koji se koristio kao kriterij uključenja, prikupljeno je ukupno 100 neponavljajućih izolata *P. mirabilis*. Izolirani su iz različitih klinički značajnih uzoraka, uzetih od pacijenata koji su bili hospitalizirani na 12 različitih klinika ili odjela bolnice (Tablica 1).

Izolati su najčešće dobiveni iz urina (44%) i različitih uzoraka uzetih s mjesta infekcija kože i mekih tkiva (30%). Preostali izolati su iz uzoraka donjeg dišnog sustava (12%), hemokultura (5%) i ostalih primarno sterilnih sijela (9%). Pacijenti s pozitivnim uzorcima su najčešće bili hospitalizirani na različitim zavodima Klinike za unutarnje bolesti (n = 36), različitim kirurškim odjelima (n = 28), i jedinicama intenzivnog liječenja (JIL) (n = 18). Ostatak izolata prikupljen je iz uzoraka pacijenata koji su boravili na klinikama za infektologiju (n = 8), za plućne bolesti (n=6), neurologiju (n = 2) i psihijatriju (n = 2).

## 4.2. Karakteristike izolata u fenotipskoj detekciji $\beta$ -laktamske rezistencije

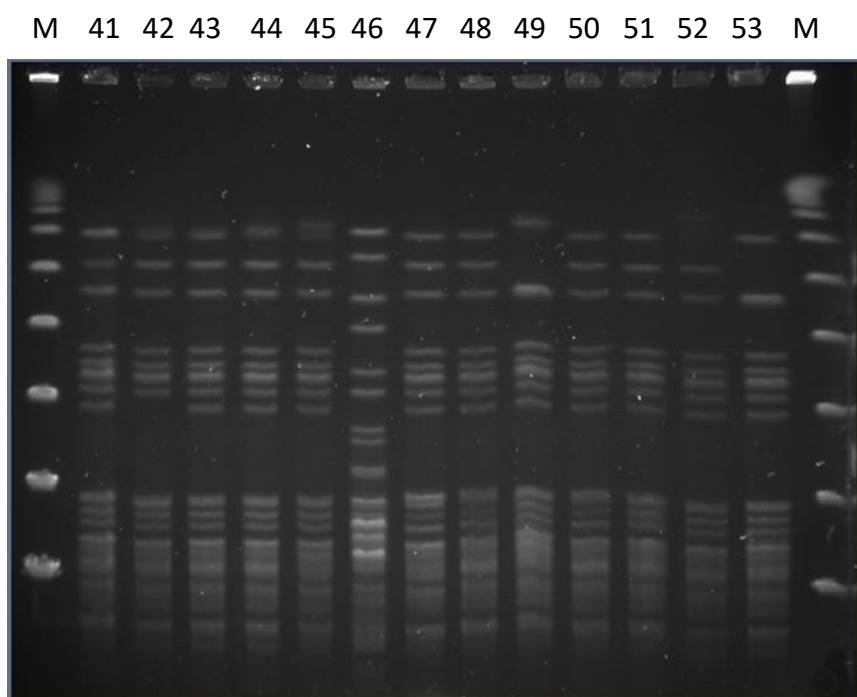
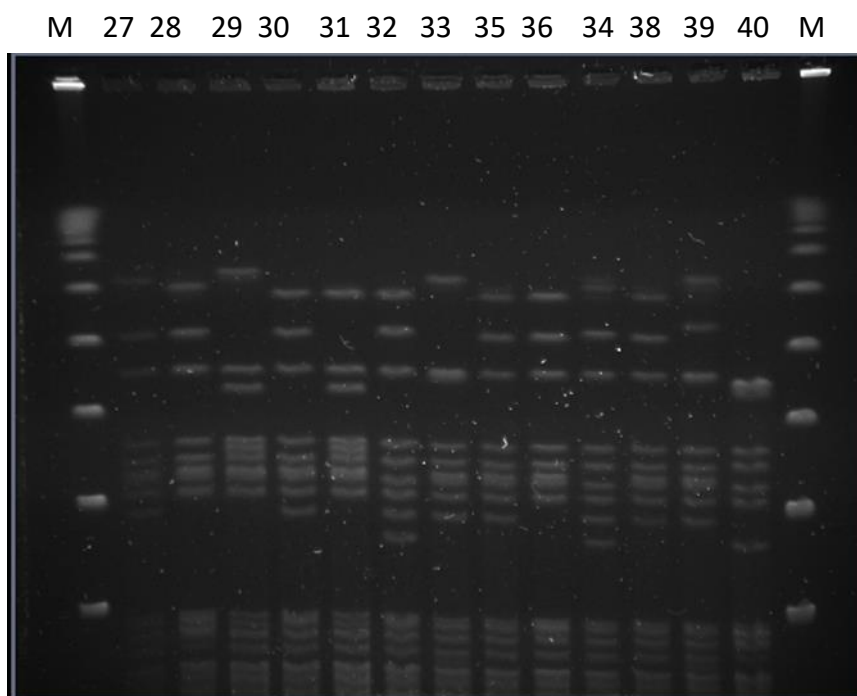
Svi izolati su se pokazali negativni u fenotipskoj detekciji lučenja ESBL enzima pomoću DDST testa urađenim na MH mediju uz dodatak kloksacilina. Suprotno tome, cefoksitin Hodge test za detekciju lučenja ABL enzima je svima pokazao pozitivan rezultat.

## 4.3. Klonska povezanost izolata

Analizirana skupina izolata pokazala je poliklonsku genetsku pozadinu, koja se sastojala od četiri klastera i dva pojedinačna makrorestriksijska profila ( $\geq 85\%$  razine genetske povezanosti) (59). Najdominantniji klaster GC1 uključivao je 79% izolata (slika 1). Izolati koji ga čine prikupljeni su na svim ranije navedenim klinikama i odjelima bolnice, što naglašava visok potencijal klonske diseminacije među pacijentima hospitaliziranim na



različitim bolničkim jedinicama. Preostala tri klastera pokrivaju 19% izolata, i prikupljeni su najvećim dijelom na kirurgiji, JIL-u, infektologiji i različitim internističkim zavodima. Singleti potječu od pacijenata iz Zavoda za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju i opekline, i Zavoda za nefrologiju i hemodijalizu (Tablica 1).



**Slika 1.** Dio profila (26/100) analiziranih višestruko otpornih izolata *P. mirabilis*, dobivenih PFGE analizom genomske DNK razgrađene *Sma*I endonukleazom. M – standard molekulske mase (CHEEF DNA Size Standard, Bio-Rad Laboratories, SAD), 27-53 MDR izolati *P. mirabilis*

**Tablica 1.** Epidemiološki podatci i genotipske karakteristike 21 reprezentativnog izolata vrste *P. mirabilis*, koji su višestruko otporni i luče AmpC β-laktamazu, i prikupljeni su iz kliničkih uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split

<i>Izolat</i>	<i>Mjesec uzorkovanja</i>	<i>PFGE profil</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Klinika ili odjel</i>	<i>ESBL</i>	<i>AmpC</i>	<i>CMY sekvenca</i>	<i>TEM sekvenca</i>	<i>ISEcp1</i>
I/4	Travanj 2013	3	AB	PLU	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/7	Travanj 2013	4	BR	INT	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/10	Travanj 2013	1	BR	JIL	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/12	Travanj 2013	1	BR	INT	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/22	Lipanj 2013	4	U	KIR (N)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/23	Lipanj 2013	2	AAbd	KIR (A)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/27	Lipanj 2013	3	U	NEU	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/29	Lipanj 2013	1	S	PLU	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/34	Lipanj 2013	single	BR	KIR (P)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/49	Srpanj 2013	2	U	KIR(UR)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
I/55	Kolovoz 2013	3	AAps	KIR (O)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/25	Studenj 2013	3	BR	INF	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/39	Studenj 2013	3	U	PSI	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/7	Prosinac 2013	3	U	INT	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/21	Prosinac 2013	3	AAps	KIR	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/35	Prosinac 2013	3	U	KIR (O)	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/43	Prosinac 2013	2	U	INT	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/50	Prosinac 2013	3	U	JIL	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/16	Veljača 2014	4	K	JIL	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/48	Veljača 2014	single	U	INT	-	+	CMY-16	TEM-1	+
II/49	Veljača 2014	4	U	KIR(UR)	-	+	CMY-16	TEM-2	+

Od 100 izolata analiziranih PFGE metodom, izabran je 21 reprezentativni predstavnik za daljnju molekularnu analizu, slučajnim odabirom iz svakog klastera, te sa svake različite bolničke lokacije, uz uključivanje oba pojedinačna makrorestriksijska profila.

Kratice: A, abdominalna kirurgija; AAbd, aspirat abdomena; AAps, aspirat apscesa; AB, aspirat bronha; BR, bris rane; ESBL, β-laktamaza proširenog spektra; JIL, jedinica intenzivnog liječenja; INF, infektologija; INT, interna medicina; K, krv; KIR, kirurgija; N, neurokirurgija; NEU, neurologija; O, opća kirurgija; P, plastična kirurgija; PFGE, gel elektroforeza u pulsirajućem polju; PLU, plućne bolesti; PSI, psihijatrija; S, sputum; single, pojedinačni makrorestriksijski profil; U, urin; UR, urologija.

#### 4.4. Molekularna karakterizacija i lokacija gena za $\beta$ -laktamazu i insercijskog elementa *ISEcp1*

Dvadeset i jedan reprezentativni predstavnik izolata uključen je u daljnju molekularnu analizu, u kojoj je gen *bla<sub>CMY-16</sub>* detektiran u svima. Također, u svih je uočena istovremena prisutnost gena za TEM  $\beta$ -laktamazu, s tim da je TEM-1 detektirana u 20, a TEM-2 u jednom reprezentativnom izolatu (Tablica 1).

PFGE metoda provedena nakon korištenja S1-nukleaze nije detektirala velike plazmide, odnosno plazmide veće od 50 kilo baznih parova (kb). Uz to, hibridizacija pomoću *bla<sub>CMY</sub>*-specifične sonde potvrdila je da položaj *bla<sub>CMY</sub>* gena nije lociran na plazmidu.

Southern blot analizom PFGE gelova razgrađenih *I-CeuI*-endonukleazom postigla se hibridizacija *bla<sub>CMY-16</sub>* i 16s rDNA sonde na iste DNK trake, ukazujući na kromosomsku lokalizaciju gena za CMY-16 ABL u svim reprezentativnim izolatima.

PCR i sekvenciranje potvrdili su prisutnost *ISEcp1* insercijskog elementa u svim reprezentativnim izolatima, s insercijom smještenom 110 parova baza (pb) uzvodno od početnog kodona za *bla<sub>CMY-16</sub>*.

#### 4.5. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti izolata

Svih 100 izolata imalo je MDR fenotip, koji je obuhvaćao otpornost na amoksisilin, kako sam tako i u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, cefuroksim, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefoksitin, i trimetoprim-sulfametoksazol. Svi osim jednog bili su otporni na kinolone, a 81% ih je bilo otporno na sve aminoglikozide. Zadržali su osjetljivost na karbapeneme, te djelomično na piperacilin/tazobaktam i cefepim (Tablica 2).

Vrijednosti MIK-a dobivene gradijent testovima za one antimikrobne lijekove kojima je održana određena osjetljivost u testiranju disk difuzijskom metodom, pokazale su da je 77% izolata bilo osjetljivo (S), i 22% imalo umjerenu osjetljivost (I) na piperacilin/tazobaktam,

dok je 4% bilo S, a 68% I na cefepim (Tablica 2). Svi izolati su bili potpuno osjetljivi na meropenem i ertapenem, dok su se vrijednosti MIK-a očekivano pokazale nešto višima za imipenem (1, 2), tako da je 89,0% izolata bilo S, a 11,0% I (Tablica 2).

Rezultati testiranja antimikrobnih lijekova koji se nisu testirali u rutinskom radu, a moguće su alternative karbapenemima, pokazali su 100%-tnu *in vitro* učinkovitost ceftazidim/avibaktama, temocilina, i fosfomicina. Nasuprot tome, samo 15% izolata je bilo S na ceftolozan/tazobaktam (Tablica 2).

**Tablica 2.** *In vitro* osjetljivost višestruko otpornih izolata *P. mirabilis* koji luče AmpC  $\beta$ -laktamazu, prikupljenih iz kliničkih uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split, na one antimikrobne lijekove koji su u potpunosti ili djelomično zadržali aktivnost u testiranju disk difuzijskom metodom, i antimikrobne lijekove koji se nisu testirali u rutinskom radu ( $n = 100$ )

Antimikrobni lijek	MIK ( $\mu\text{g/mL}$ )			Interpretacija MIK-a* (%)		
	50%	90%	Raspon	Osjetljiv	Umjereno osjetljiv**	Rezistentan
Piperacilin/tazobaktam	4	12	1-32	77,0	22,0	1,0
Ceftolozan/tazobaktam	3	12	0,125-24	15,0	0	85,0
Ceftazidim/avibaktam	0,094	0,25	<0,016-0,5	100	0	0
Cefepim	3	8	0,75-32	4,0	68,0	28,0
Imipenem	0,38	3	0,094-6	89,0	11,0	0
Meropenem	0,047	0,094	0,016-0,38	100	0	0
Ertapenem	0,016	0,032	0,008-0,19	100	0	0
Temocilin	2	3	1-6	100	0	0
Fosfomicin	0,75	2	0,19-8	100	0	0

\*MIK-ovi su određeni uz pomoć gradijent testova, a u interpretaciji su za sve antimikrobne lijekove korišteni kriteriji EUCAST-a (101), osim za temocilin gdje su korišteni interpretacijski kriteriji za enterobakterije koje preporučuje BSAC (110)

\*\*osjetljiv uz povećanu izloženost antimikrobnom lijeku

Kratice: BSAC, Britansko društvo za antimikrobnu kemoterapiju; EUCAST, Europsko povjerenstvo za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove; MIK, minimalna inhibitorna koncentracija.

## **4.6. Povezanost rizičnih čimbenika s pojavom sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima vrste *Proteus mirabilis* koji luče AmpC β-laktamazu**

### **4.6.1. Prikupljeni podatci**

Prikupljeni podatci su raspoređeni u dva uzorka:

1. uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* koji luči ABL (MDRPM skupina) (n=73), i
2. uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči ABL (OPM skupina) (n=74).

Prvi uzorak predstavlja ispitnu, a drugi uzorak kontrolnu skupinu.

Podatci su prikupljeni u periodu od 2019. do 2023. godine, na način da je iz laboratorijskog informacijskog sustava KBC-a Split izdvojen popis svih bolesnika koji su bolovali od sepse kojoj je uzročnik *P. mirabilis*, te su primijenjeni kriteriji uključenja i isključenja kako je navedeno u odjeljku 3.2.2.

Za svakog pacijenta je izmjeren niz relevantnih demografskih, epidemioloških i kliničkih obilježja. Veći dio obilježja (ili "varijabli") je kategorijskog tipa, a numerička su samo dva: dob, te za umrle, broj dana od pojave sepse do smrti.

Podaci su učitani iz Excel tablice u SAS Ver. 9.4.

### **4.6.2. Rezultati univarijatne opisne statistike**

U Tablici 3 navedene su frekvencije i postotci (%) za kategorijske varijable (demografske, epidemiološke i kliničke) u odnosu na MDRPM i OPM skupinu, te ukupno.

Na sličan način, Tablice 4 i 5 sadrže opisne statistike za numeričke varijable (dob i broj dana od početka sepse do smrti za umrle pacijente).

Po demografskim karakteristikama (spol i dob) pacijenti su u obje skupine (MDRPM i OPM) bili razmjerno ujednačeni, s 53% muških u MDRPM i 55% u OPM skupini (Tablica 3), te sa medijalnom dobi od 77 godina u MDRPM i 75.5 u OPM skupini (Tablica 3).

Što se ostalih obilježja tiče, istaknut ćemo neka od njih.

Po izvoru infekcije, čini se da se skupine ne razlikuju, sa mokraćnim sustavom kao najučestalijim izvorom infekcija u obje skupine (73% u MDRPM i 80% u OPM skupini).

Sveukupno 20% pacijenata je pristiglo iz staračkog doma. Po tome se skupine također neznatno razlikuju, s 22% takvih pacijenata u MDRPM i 17% u OPM skupini.

Razlike su uočljive u bolničkim/izvanbolničkim infekcijama, pri čemu su bolničke infekcije zastupljene s 44% pacijenata u MDRPM skupini, a sa svega 26% u pacijenata u OPM skupini.

Također, hospitalizacija u trajanju od 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci zabilježena je u 73% pacijenata u MDRPM skupini, za razliku od svega 32% u OPM skupini.

Pacijenti iz MDRPM skupine su u znatno višem postotku primili antimikrobnu terapiju u trajanju od 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca (60% u odnosu na svega 27% u OPM skupini).

COVID u trenutku sepse ili preboljeli teži COVID (s hospitalizacijom) u prethodna 3 mjeseca bio je registriran u 21% pacijenata u MDRPM skupini, i u samo 7% onih iz OPM skupine.

Kortikosteroidnu terapiju primalo je 22% pacijenata iz MDRPM skupine, a 9% pacijenata iz OPM skupine.

Tešku traumu doživjelo je 18% pacijenata iz MDRPM skupine, u odnosu na 7% onih iz OPM skupine.

**Tablica 3.** Frekvencijske tablice za kategorijske varijable u odnosu na MDRPM i OPM skupinu, te ukupno

	<i>P. mirabilis</i> – skupine				Ukupno	
	MDRPM		OPM			
	N	%	N	%	N	%
<b>Spol</b>						
Muško	39	53.42	41	55.41	80	54.42
Žensko	34	46.58	33	44.59	67	45.58
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Izvor infekcije</b>						
mokraćni sustav	53	72.60	59	79.73	112	76.19
Dekubitis	12	16.44	9	12.16	21	14.29
dišni sustav	5	6.85	1	1.35	6	4.08
Nepoznato	1	1.37	4	5.41	5	3.40
kosti i duboka tkiva	2	2.74	0	0	2	1.36
centralni venski kateter	0	0	1	1.35	1	0.68
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Bolnička ili izvanbolnička infekcija</b>						
bolnička infekcija	32	43.84	19	25.68	51	34.69
izvanbolnička infekcija	41	56.16	55	74.32	96	65.31
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Prijem u bolnicu iz</b>						
vlastiti dom	51	69.86	60	81.08	111	75.51
starački dom	16	21.92	13	17.57	29	19.73
druga zdravstvena ustanova	6	8.22	1	1.35	7	4.76
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Hospitalizacija u trajanju ≥48 h u prethodnih 12 mjeseci</b>						
Da	53	72.60	24	32.43	77	52.38
Ne	20	27.40	50	67.57	70	47.62
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Kirurški zahvat neposredno povezan s nastankom infekcije</b>						
Da	5	6.85	4	5.41	9	6.12
Ne	68	93.15	70	94.59	138	93.88
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Antimikrobna terapija u trajanju ≥48 h u prethodna 3 mjeseca</b>						
Da	44	60.27	20	27.03	64	43.54
Ne	29	39.73	54	72.97	83	56.46
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00



	<i>P. mirabilis</i> – skupine				Ukupno	
	MDRPM		OPM			
	N	%	N	%	N	%
<b>Invazivni zahvat u prethodnih 30 dana od početka sepse</b>						
Da	28	38.36	21	28.38	49	33.33
Ne	45	61.64	53	71.62	98	66.67
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Vrsta invazivnog zahvata</b>						
urinarni kateter	12	16.44	7	9.46	19	12.93
centralni venski kateter	1	1.37	0	0	1	0.68
mehanička ventilacija	1	1.37	0	0	1	0.68
Ostalo	2	2.74	3	4.05	5	3.40
dva različita invazivna zahvata	5	6.85	6	8.11	11	7.48
tri različita invazivna zahvata	7	9.59	4	5.41	11	7.48
četiri različita invazivna zahvata	0	0	1	1.35	1	0.68
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Kortikosteroidna terapija</b>						
Da	16	21.92	7	9.46	23	15.65
Ne	57	78.08	67	90.54	124	84.35
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Druga imunokompromitirajuća stanja</b>						
Da	23	31.51	23	31.08	46	31.29
Ne	50	68.49	51	68.92	101	68.71
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Vrsta drugog imunokompromitirajućeg stanja</b>						
Kaheksija	1	1.37	2	2.70	3	2.04
opće loše stanje zbog starosti, nepokretnosti ili nekog drugog stanja	20	27.40	20	27.03	40	27.21
Oboje	2	2.74	0	0	2	1.36
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Teška trauma</b>						
Da	13	17.81	5	6.76	18	12.24
Ne	60	82.19	69	93.24	129	87.76
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Karcinom</b>						
Da	12	16.44	8	10.81	20	13.61
Ne	61	83.56	66	89.19	127	86.39
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00

	<i>P. mirabilis</i> – skupine				Ukupno	
	MDRPM		OPM			
	N	%	N	%	N	%
<b>COVID-19 u trenutku sepse ili preboljeli teži COVID-19 (s hospitalizacijom) u prethodna 3 mjeseca</b>						
Da	15	20.55	5	6.76	20	13.61
Ne	58	79.45	69	93.24	127	86.39
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00
<b>Dužina hospitalizacije</b>						
dugo (više od 10 dana)	44	60.27	32	43.24	76	51.70
srednje dugo (6-10 dana)	19	26.03	23	31.08	42	28.57
kratko (0-5 dana)	10	13.70	19	25.68	29	19.73
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00

Kratice: COVID-19, Coronavirus disease 2019; .MDRPM, uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse višestruko otporni *P. mirabilis* i koji luči AmpC β-laktamazu; OPM, uzorak pacijenata kojima je uzročnik sepse osjetljivi *P. mirabilis* koji ne luči AmpC β-laktamazu.

**Tablica 4.** Opisne statistike za numeričke varijable (dob i broj dana od početka sepse do smrti za umrle pacijente), gledajući ukupno

N Obs	Varijable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
147	Dob	147	74.16	11.54	46.00	67.00	76.00	83.00	97.00
	Broj umrlih	25							
	Broj dana od pojave sepse do trenutka kad je nastupila smrt		8.08	10.61	1.00	1.00	6.00	11.00	51.00

**Tablica 5.** Opisne statistike za numeričke varijable (dob i broj dana od početka sepse do smrti za umrle pacijente), u odnosu na MDRPM i OPM skupinu

<i>P. mirabilis</i> skupine	N Obs	Varijable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
MDRPM	73	Dob	73	74.21	11.33	47.00	67.00	77.00	83.00	94.00
		Broj umrlih	10							
		Broj dana od pojave sepse do trenutka kad je nastupila smrt		11.60	14.65	1.00	4.00	7.00	12.00	51.00
OPM	74	Dob	74	74.12	11.83	46.00	66.00	75.50	82.00	97.00
		Broj umrlih	15							
		Broj dana od pojave sepse do trenutka kad je nastupila smrt		5.73	6.35	1.00	1.00	3.00	10.00	23.00

#### **4.6.3. Rezultati bivarijatne analize asocijacija kategorijskih varijabli s MDRPM i OPM skupinama pacijenata**

U Tablici 6 navedeni su stupnjevi slobode (df), vrijednost  $\chi^2$  statistike (Value), p-vrijednost  $\chi^2$  testa asocijacije (Prob (Chi2)) i p-vrijednost Fisherovog egzaktnog testa (Prob (Fisher)) za asocijacije između MDRPM i OPM skupina i kategorijskih varijabli. Može se uočiti da su asocijacije s pojedinom skupinom statistički značajne (na razini  $\alpha=0.05$ ) za sljedeće kategorijske varijable rizičnih čimbenika:

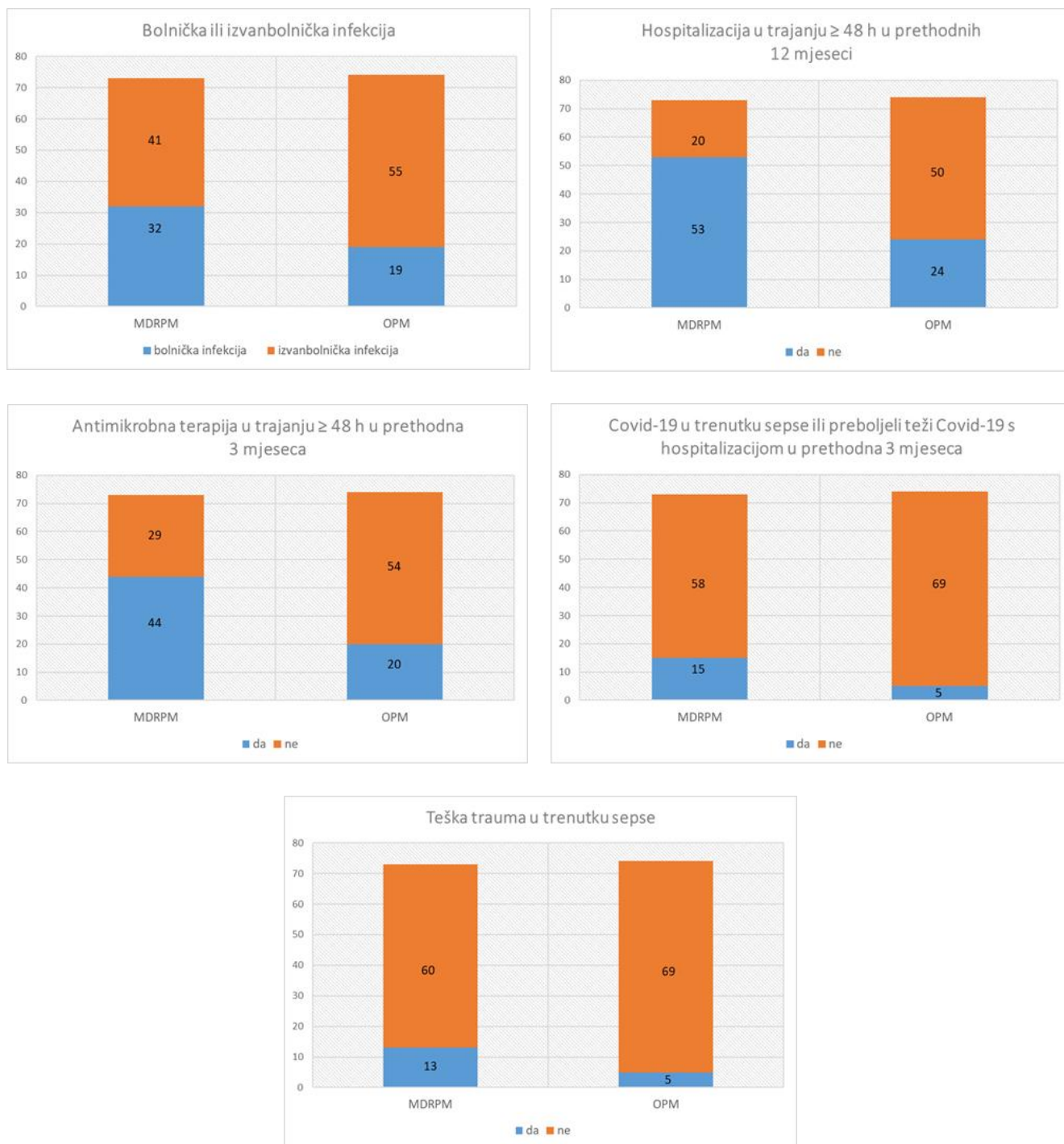
- bolnička ili izvanbolnička infekcija
- hospitalizacija u trajanju 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci
- antimikrobna terapija u trajanju 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca
- COVID-19 u trenutku sepse ili preboljeli teži COVID-19 (s hospitalizacijom) u prethodna 3 mjeseca
- teška trauma

Na slici 2 vizualizirane su razlike između MDRPM i OPM skupine pacijenata za pet gore navedenih kategorijskih varijabli, za koje su pronađene statistički značajne asocijacije s tipom skupine. Primjerice, lako se može uočiti da je u MDRPM skupini bilo 53 od 73 (73%) prethodno hospitaliziranih pacijenata, dok ih je u OPM skupini bilo znatno manje (24 od 74 ili 32%).

**Tablica 6.** Testovi asocijacija kategorijskih varijabli s MDRPM i OPM skupinama pacijenata

	df	Value	Prob (Chi <sup>2</sup> )	Prob (Fisher)
<b>Asocijacije</b>				
<b>spol i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	0.0581	0.8095	0.8691
<b>uroinfekcija kao izvor i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	5	8.2102	0.1450	0.1366
<b>bolnička ili izvanbolnička infekcija i <i>P. mirabilis</i> skupine*</b>	1	5.3488	0.0207	0.0247
<b>prijem iz staračkog doma i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	2	4.6049	0.1000	0.0894
<b>prethodna hospitalizacija i <i>P. mirabilis</i> skupine *</b>	1	23.7735	<.0001	<.0001
<b>povezani kirurški zahvat i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	0.1333	0.7150	0.7452
<b>prethodna antimikrobna terapija i <i>P. mirabilis</i> skupine *</b>	1	16.5241	<.0001	<.0001
<b>prethodni invazivni zahvat i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	1.6463	0.1995	0.2236
<b>karcinom i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	0.9901	0.3197	0.3463
<b>COVID-19 i <i>P. mirabilis</i> skupine*</b>	1	5.9462	0.0147	0.0169
<b>kortikosteroidna terapija i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	4.3216	0.0376	0.0431
<b>imunokompromitirajuća stanja i <i>P. mirabilis</i> skupine</b>	1	0.0031	0.9556	1.0000
<b>teška trauma i <i>P. mirabilis</i> skupine *</b>	1	4.1769	0.0410	0.0471

\* Asocijacija značajna na razini  $p < 0.05$  (alpha = 5%)



**Slika 2.** Grafički prikaz razlika između MDRPM i OPM skupina pacijenata za pet kategorijskih varijabli kojima je dokazana statistički značajna asocijacija s pojedinom skupinom

#### 4.6.4. Rezultati logističke regresijske analize za predviđanje vjerojatnosti obolijevanja od sepse koju uzrokuje višestruko otporni *P. mirabilis*, na osnovu izmjerenih obilježja

Budući da je velika većina obilježja/potencijalnih prediktora međusobno povezana, tj. u visokoj su međusobnoj asocijaciji, model sa svim potencijalnim prediktorima nije dobar model u smislu mogućnosti visoke pogreške.

Zbog gore navedenog, primijenjeno je više metoda za izbor prediktorskih varijabli, te je odabran onaj sa najmanjom mjerom pogreške, tj. sa najnižom vrijednošću Akaike informacijskog kriterija (engl. *The Akaike information criterion*; AIC). U Tablicama 7 i 8 su usporedno prikazani rezultati za multivarijatni model logističke regresije sa svim prediktorima (1), model sa odabranim prediktorima (2), i za univarijatne modele logističke regresije (tj. modele sa po jednim prediktorom).

**Tablica 7.** P vrijednosti za testiranje značajnosti prediktorskih varijabli u univarijatnim i multivarijatnim modelima logističke regresije

Prediktorske varijable	Univarijatne P vrijednosti	Multivarijatne (1) P vrijednosti	Multivarijatne (2) P vrijednosti
prijem u bolnicu iz staračkog doma	0.1550	0.1367	-
bolnička ili izvanbolnička infekcija	0.0219	0.0099	0.0200
prethodna hospitalizacija	<.0001	0.0005	<.0001
povezani kirurški zahvat	0.7156	0.1866	-
prethodna antimikrobna terapija	<.0001	0.0071	0.0011
prethodni invazivni zahvat	0.2007	0.1445	-
kortikosteroidna terapija	0.0428	0.8581	-
imunokompromitirajuća stanja	0.9556	0.3363	-
teška trauma	0.0485	0.5103	-
COVID-19	0.0199	0.1262	-
Karcinom	0.3228	0.1319	-

(1) multivarijatni model logističke regresije sa svim prediktorima

(2) multivarijatni model logističke regresije sa prediktorima odabranim „backward“ metodom

**Tablica 8.** Omjeri izgleda prediktorskih varijabli u univarijatnim i multivarijatnim modelima logističke regresije

	Univarijatni omjeri izgleda (OR, DG, GG)			Multivarijatni (1) omjeri izgleda (OR, DG, GG)			Multivarijatni (2) omjeri izgleda (OR, DG, GG)		
<b>Prediktori i usporedbe</b>									
muški spol vs ženski spol	0.92	0.48	1.77	1.17	0.39	3.47	-	-	-
prijem iz vlastitog doma vs prijem iz staračkog doma	0.69	0.30	1.57	0.64	0.14	2.96	-	-	-
prijem iz druge zdravstvene ustanove vs prijem iz staračkog doma	4.87	0.52	45.75	9.67	0.58	161.20	-	-	-
bolnička infekcija vs izvanbolnička infekcija	2.26	1.13	4.54	6.69	1.58	28.31	2.64	1.17	5.98
prethodna hospitalizacija: da vs ne	5.52	2.72	11.21	8.46	2.56	27.98	6.20	2.82	13.62
povezani kirurški zahvat: da vs ne	1.29	0.33	5.00	0.10	0.00	3.11	-	-	-
prethodna antimikrobna terapija: da vs ne	4.10	2.04	8.21	4.77	1.53	14.87	3.61	1.67	7.78
prethodni invazivni zahvat: da vs ne	1.57	0.79	3.14	0.35	0.08	1.44	-	-	-
kortikosteroidna terapija: da vs ne	2.69	1.03	6.98	1.16	0.23	5.75	-	-	-
imunokompromitirajuća stanja: da vs ne	1.02	0.51	2.05	1.88	0.52	6.80	-	-	-
teška trauma: da vs ne	2.99	1.01	8.87	1.88	0.29	12.34	-	-	-
Covid-19: da vs ne	3.57	1.22	10.41	3.95	0.68	22.92	-	-	-
karcinom: da vs ne	1.62	0.62	4.24	3.01	0.72	12.60	-	-	-

- (1) multivarijatni model logističke regresije sa svim prediktorima  
(2) multivarijatni model logističke regresije sa prediktorima odabranim „backward“ metodom

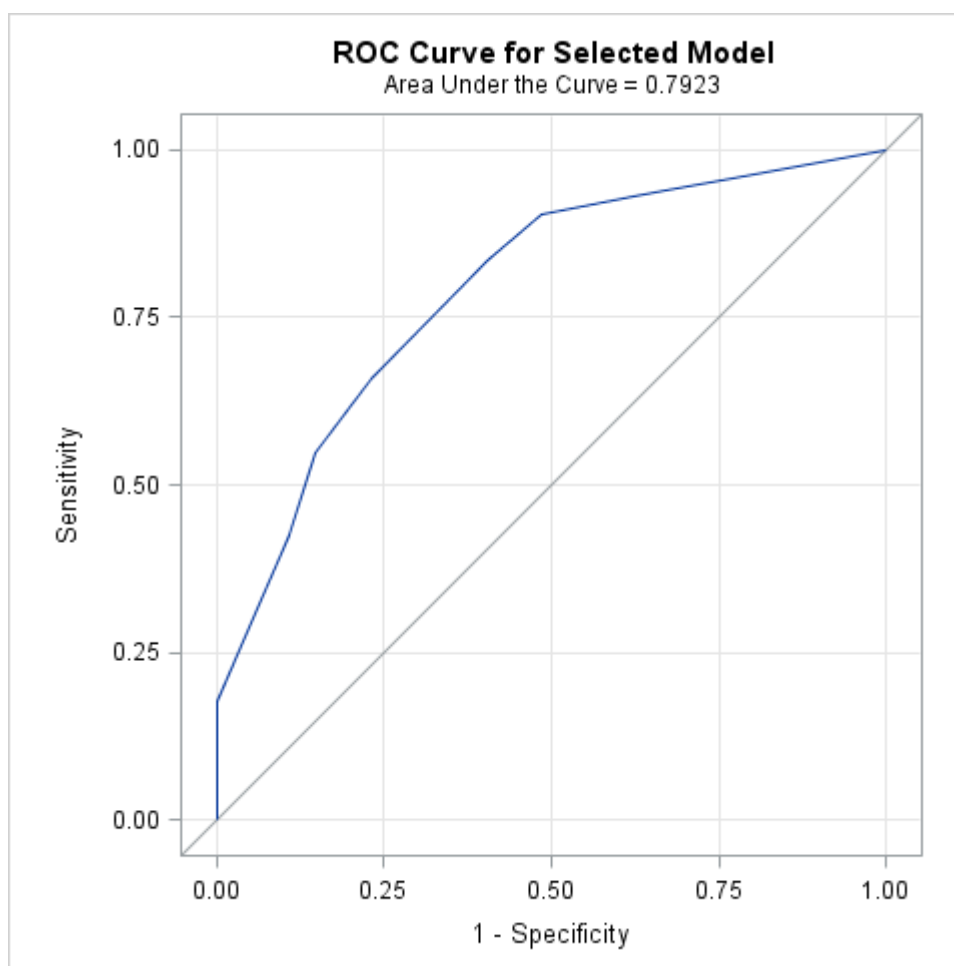
Kratice: OR, omjer izgleda (engl. *odds ratio*); DG, donja granica 95%-tnog intervala pouzdanosti za omjer izgleda; GG, gornja granica 95%-tnog intervala pouzdanosti za omjer izgleda.

Odabrani model (multivarijatni model (2) logističke regresije sa prediktorima odabranim „backward“ metodom) sadrži slijedeće tri prediktorske varijable (obilježja):

- bolnička ili izvanbolnička infekcija
- hospitalizacija u trajanju 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci
- antimikrobna terapija u trajanju 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca



Za navedeni model je hipoteza da su svi populacijski regresijski koeficijenti jednaki 0 odbačena (uz p-vrijednost < 0.0001), a regresijski koeficijenti za odabrane tri varijable su statistički značajni (sa p-vrijednostima 0.02, <0.0001 i 0.001). Vrijednost ROC indeksa modela iznosi 0.79, kao što je prikazano na ROC krivulji na slici 3 (krivulja operativnih karakteristika; engl. *receiver operating characteristic curve*).

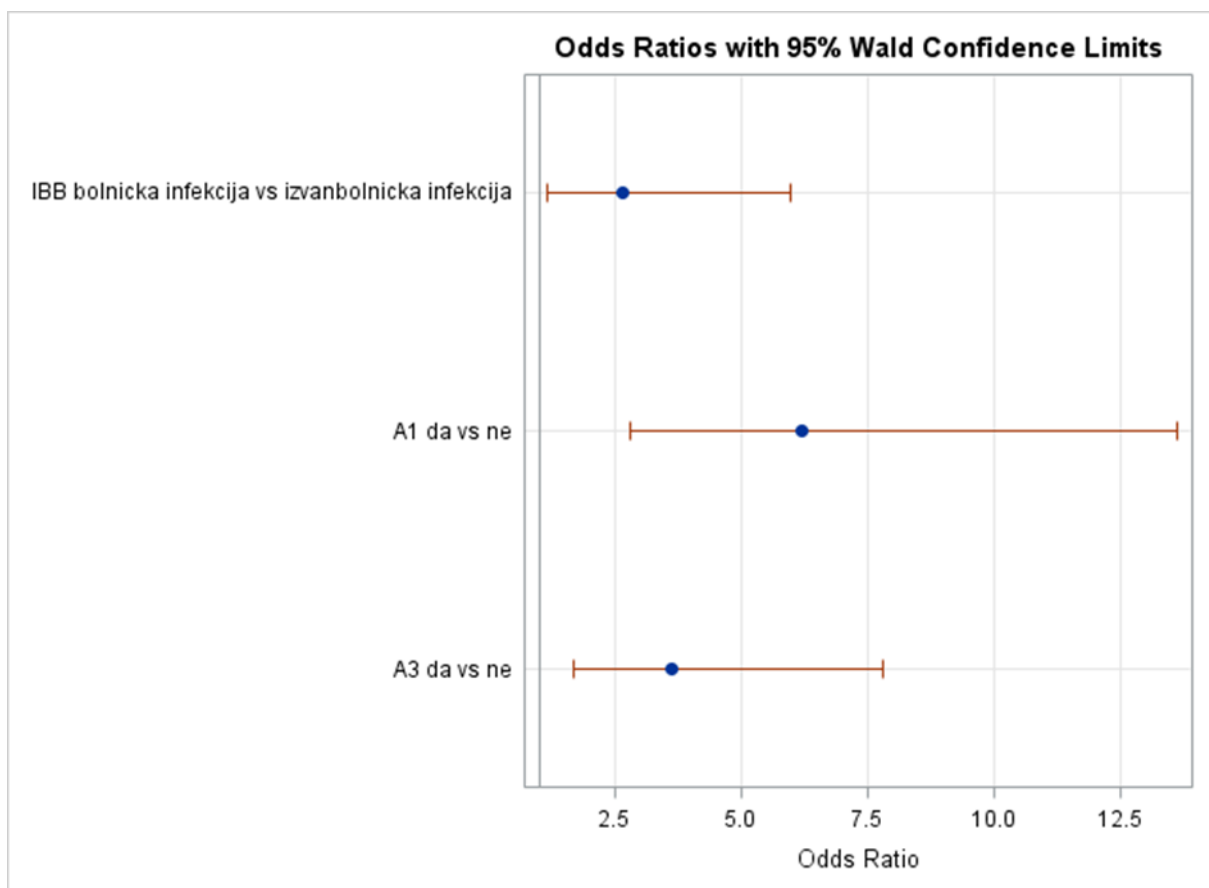


**Slika 3.** ROC krivulja za multivarijatni model (2) logističke regresije (sve varijable)

Međutim, za interpretaciju su najvažnije vrijednosti omjera izgleda, navedene zajedno sa pripadajućim 95%-tnim intervalima pouzdanosti u Tablici 8 i vizualizirane na slici 4:

- Izgled za sepsu koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* u odnosu na sepsu čiji je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis* je 2.64 (1.17 - 5.98) puta veći za pacijente sa bolničkom infekcijom u odnosu na pacijente sa izvanbolničkom infekcijom.

- Izgled za sepsu koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* u odnosu na sepsu čiji je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis* je 3.61 (1.67 - 7.78) puta veći za pacijente koji su primali antimikrobnu terapiju u trajanju od 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca, u odnosu na pacijente bez prethodne antimikrobne terapije u trajanju od 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca.
- Izgled za sepsu koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* u odnosu na sepsu čiji je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis* je 6.2 (2.82 - 13.62) puta veći za pacijente koji su bili hospitalizirani u trajanju od 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci, u odnosu na pacijente bez prethodne hospitalizacije u trajanju od 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci.



**Slika 4.** Omjeri izgleda sa 95%-tnim intervalima pouzdanosti za prediktore u multivarijantnom modelu (2) logističke regresije.

Kratice: A1, hospitalizacija u trajanju  $\geq 48$  h u prethodnih 12 mjeseci; A3, antimikrobna terapija u trajanju  $\geq 48$  h u prethodna 3 mjeseca; IBB, izvanbolnička ili bolnička infekcija.

#### 4.7. Povezanost sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *Proteus mirabilis* koji luče Ampc $\beta$ -laktamazu i neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja

##### 4.7.1. Rezultati univarijatne opisne statistike

Iz Tablice 9 je vidljivo da empirijska antimikrobna terapija u prvih 24 h od nastanka sepse nije bila primjerena u 26% pacijenata iz MDRPM skupine, dok nitko u OPM skupini nije imao neprimjerenu terapiju (0%).

**Tablica 9.** Frekvencije primjerene empirijske antimikrobne terapije u odnosu na MDRPM i OPM skupinu, te ukupno.

	<i>P. mirabilis</i> – skupine				Ukupno	
	MDRPM		OPM			
	N	%	N	%	N	%
<b>Primjerena empirijska antimikrobna terapija u prvih 24 h od nastanka sepse</b>						
Da	47	64.38	74	100.00	121	82.31
Ne	26	35.62	0	0	26	17.69
<b>Ukupno</b>	73	100.00	74	100.00	147	100.00

##### 4.7.2. Rezultati bivarijatne analize asocijacije primjerenosti empirijskog antimikrobnog liječenja s MDRPM i OPM skupinama pacijenata

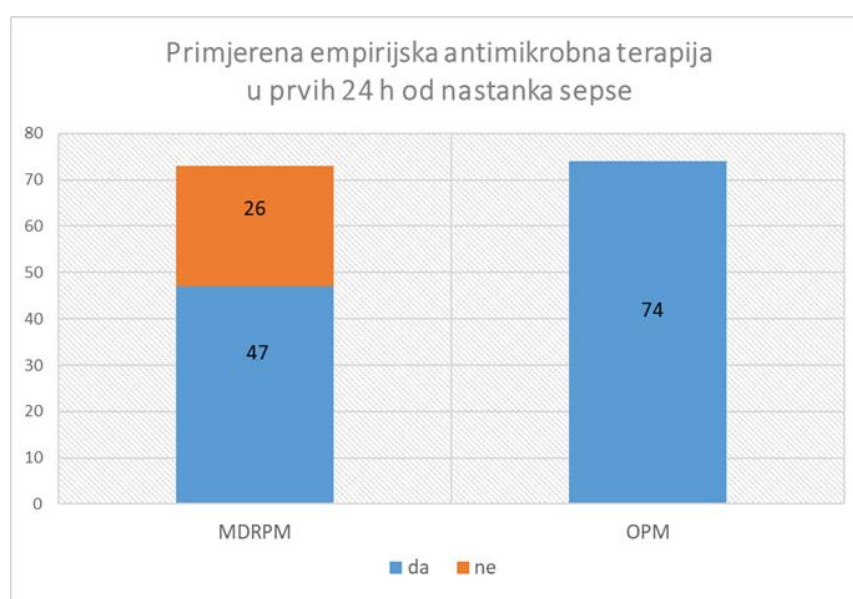
U Tablici 10 su stupnjevi slobode (df), vrijednost  $\chi^2$  statistike (Value), p-vrijednost  $\chi^2$  testa asocijacije (Prob (Chi2)) i p-vrijednost Fisherovog egzaktnog testa (Prob (Fisher)) za gore navedenu asocijaciju. Postoji statistički značajna asocijacija (na razini  $\alpha=0.05$ ) primjerene empirijske antimikrobne terapije u prvih 24 h od nastanka sepse s pojedinom skupinom.

Isto se lako vizualizira na slici 5.

**Tablica 10.** Testovi asocijacije primjerene antimikrobne terapije s MDRPM i OPM skupinama pacijenata

	df	Value	Prob (Chi <sup>2</sup> )	Prob (Fisher)
<b>Asocijacije</b>				
<b>primjerena empirijska antimikrobna terapija i <i>P. mirabilis</i> skupine *</b>	1	32.0195	<.0001	<.0001

\* Asocijacija značajna na razini  $p < 0.05$  (alpha=5%)



**Slika 5.** Grafički prikaz razlike između MDRPM i OPM skupine pacijenata vezane uz primjerenu empirijsku antimikrobnu terapiju u prvih 24 h od nastanka sepse

#### **4.7.3. Rezultati logističke regresijske analize za predviđanje vjerojatnosti neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja u odnosu na sepsu kojoj je uzročnik MDR ili osjetljivi *P. mirabilis***

S ciljem ispitivanja hipoteze o većoj vjerojatnosti neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, u odnosu na sepsu uzrokovanu osjetljivim izolatima koji ne luče ABL, provedena je univarijatna logistička regresijska analiza za predviđanje vjerojatnosti (i omjera rizika) neprimjerenog

empirijskog antimikrobnog liječenja u prvih 24 h od nastanka sepse, na osnovu MDRPM i OPM skupine kao jedinom prediktorskom varijablom.

Zbog činjenice da su svi pacijenti u OPM skupini dobili primjereno empirijsko antimikrobno liječenje u prvih 24 h od nastanka sepse, primjena standardne logističke regresije dovodi do kvazi-kompletne separacije i nemogućnosti procjene parametara modela.

Zbog toga je primijenjena Firthova metoda logističke regresije (111). Iako je hipoteza da su populacijski regresijski koeficijenti jednaki 0 odbačena, model s MDRPM i OPM skupinama kao jedinom varijablom je razmjerno slab, s velikom pogreškom i širokim intervalom pouzdanosti za omjer izgleda.

Rezultati testova i procjene parametara su prikazani u Tablici 11. Na osnovu procijenjenih parametara (regresijskih koeficijenata) -5.004 i 4.4204, procijenjene vjerojatnosti neprimjerene empirijske terapije iznose 0.36 za MDRPM skupinu i 0.007 za OPM skupinu.

**Tablica 11.** Model logističke regresije za predviđanje vjerojatnosti neprimjerene empirijske terapije u liječenju sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* u odnosu na sepsu koju uzrokuje osjetljivi *P. mirabilis*

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-Square	DF	Pr > ChiSq
Likelihood Ratio	38.4687	1	<.0001
Score	31.4292	1	<.0001
Wald	9.3033	1	0.0023

Analysis of Penalized Maximum Likelihood Estimates					
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept (OPM)	1	-5.0040	1.4286	12.2700	0.0005
MDRPM	1	4.4204	1.4493	9.3033	0.0023

<b>Odds Ratio Estimates</b>			
<b>Effect</b>	<b>Point Estimate</b>	<b>95% Wald Confidence Limits</b>	
<b>MDRPM vs OPM</b>	83.132	4.855	>999.999

#### 4.8. Povezanost antimikrobnog lijeka primijenjenog empirijski u prva 24 h i mikrobiološke eradikacije u periodu od 72 h od pojave sepse

Zahvaljujući prikupljenim podacima, ispitana je povezanost antimikrobnog lijeka primijenjenog empirijski u prva 24 h od pojave prvih simptoma sepse, s mikrobiološkom eradikacijom u periodu od 72 h od pojave sepse.

U Tablicama 12 i 13 navedene su p-vrijednosti, frekvencije i postotci za testiranje asocijacija između mikrobiološke eradikacije i pojedinog antimikrobnog lijeka, u odnosu na MDRPM i OPM skupinu. Asocijacije su analizirane odvojeno za MDRPM i OPM skupinu, jer asocijacije između mikrobiološke eradikacije i pojedinog empirijski primijenjenog antimikrobnog lijeka općenito nisu homogene po skupinama (tj. omjeri rizika su drugačiji u MDRPM skupini od onih u OPM skupini).

Statistička značajnost (na razini  $p < 0.05$ ) uočena je za karbapeneme i fluorokinolone u MDRPM skupini.

Iz Tablice 12 može se uočiti da je u MDRPM skupini pacijenata postotak eradikiranih znatno veći za one koji su liječeni karbapenemima u prva 24 h (93%), nego za one pacijente koji ga nisu odmah primali (72%). Za fluorokinolone je upravo suprotno: među onima koji su liječeni fluorokinolonima u prva 24 h ima 57% eradikiranih, za razliku od 90% eradikiranih među onima koji ga nisu uzimali (tj. primali su u prvih 24 h neki drugi antimikrobni lijek).

Za navedena dva antibiotika procijenjeni su omjeri rizika (navedeni u Tablicama 14 i 15), koji vode do slijedeće interpretacije:

- U slučaju sepse koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, izgled mikrobiološke eradikacije u periodu od 72 h od početka sepse je 5 (1.2-20.2) puta veći za one pacijente koji su liječeni karbapenemima u prva 24 h, u odnosu na one pacijente koji nisu.
- U slučaju sepse koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, izgled mikrobiološke eradikacije je 6.7 ( $6.7 = 1/0.15$ ), (0.04 - 0.58) puta manji za one pacijente koji su liječeni fluorokinolonima u prva 24 h, u odnosu na one pacijente koji su liječeni drugim antimikrobnim lijekom.

**Tablica 12.** P-vrijednosti testova asocijacija ( $\chi^2$  i Fisherov egzaktni test) između mikrobiološke eradikacije i pojedinog empirijski primijenjenog antimikrobnog lijeka, u odnosu na MDRPM i OPM skupinu

	<i>P. mirabilis</i> skupine							
	MDRPM				OPM			
	df	Value	Prob (Chi2)	Prob (Fisher)	df	Value	Prob (Chi2)	Prob (Fisher)
<b>ANTIBIOTIK</b>								
<b>ampicilin ili amoksicilin s inhibitorima <math>\beta</math>-laktamaze</b>	1	3.9340	0.0473	0.0823	1	0.0088	0.9252	1.0000
<b>piperacilin/tazobaktam</b>	1	0.8325	0.3616	1.0000	1	0.1584	0.6906	1.0000
<b>cefalosporini 1. i 2. generacije</b>	1	5.1539	0.0232	0.1644	1	0.0039	0.9499	1.0000
<b>cefalosporini 3. generacije</b>	1	0.8298	0.3623	0.3233	1	0.3288	0.5663	1.0000
<b>ceftazidim/avibaktam</b>	1	0.6155	0.4327	1.0000	1	0.1584	0.6906	1.0000
<b>karbapenemi *</b>	1	5.6650	0.0173	0.0254	1	1.2432	0.2649	0.2683
<b>fluorokinoloni *</b>	1	8.8016	0.0030	0.0084	1	0.5240	0.4692	0.7132
<b>Aminoglikozidi</b>	1	5.1539	0.0232	0.1644	1	0.1584	0.6906	1.0000
<b>Makrolidi</b>	1	0.1995	0.6552	1.0000	1	0.1584	0.6906	1.0000
<b>Klindamicin</b>	1	0.2258	0.6346	0.5205	1	2.1946	0.1385	0.1837
<b>Glikopeptidi</b>	1	0.6501	0.4201	0.4213	1	2.3414	0.1260	0.2536
<b>Metronidazol</b>	1	0.2258	0.6346	0.5205	1	0.6607	0.4163	1.0000
<b>Ostalo</b>	1	5.1539	0.0232	0.1644	-	-	-	-

\* Asocijacija značajna na razini  $p < 0.05$  ( $\alpha=5\%$ )

**Tablica 13.** Frekvencije i postotci mikrobiološke eradikacije u periodu od 72 h od pojave sepse, po antimikrobnim lijekovima primijenjenim empirijski u prva 24 h od početka sepse, i po MDRPM i OPM skupinama



Antibiotik primijenjen u prva 24 h od pojave sepsa	<i>P. mirabilis</i> skupine								Ukupno pacijenata liječenih antibiotikom	
	MDRPM				OPM					
	Mikrobiološka eradikacija u periodu od 72 h od pojave sepsa				Mikrobiološka eradikacija u periodu od 72 h od pojave sepsa					
	Da		ne		da		ne			
	N	% eradikiran	N	% eradikiran	N	% eradikiran	N	% eradikiran		
<b>ampicilin ili amoksisilin s inhibitorima <math>\beta</math>-laktamaze</b>										
Da	4	57.14	3	42.86	12	85.71	2	14.29	21	14.29
Ne	57	86.36	9	13.64	52	86.67	8	13.33	126	85.71
<b>piperacilin/tazobaktam</b>										
Da	4	100.00	0	0	1	100.00	0	0	5	3.40
Ne	57	82.61	12	17.39	63	86.30	10	13.70	142	96.60
<b>cefalosporini 1. i 2. generacije</b>										
Da	0	0	1	100.00	6	85.71	1	14.29	8	5.44
Ne	61	84.72	11	15.28	58	86.57	9	13.43	139	94.56
<b>cefalosporini 3. generacije</b>										
Da	5	71.43	2	28.57	11	91.67	1	8.33	19	12.93
Ne	56	84.85	10	15.15	53	85.48	9	14.52	128	87.07
<b>ceftazidim/avibaktam</b>										
Da	3	100.00	0	0	1	100.00	0	0	4	2.72
Ne	58	82.86	12	17.14	63	86.30	10	13.70	143	97.28
<b>Karbapenemi</b>										
Da	38	92.68	3	7.32	15	78.95	4	21.05	60	40.82
Ne	23	71.88	9	28.13	49	89.09	6	10.91	87	59.18
<b>Fluorokinoloni</b>										
Da	8	57.14	6	42.86	20	90.91	2	9.09	36	24.49
Ne	53	89.83	6	10.17	44	84.62	8	15.38	111	75.51
<b>Aminoglikozidi</b>										
Da	0	0	1	100.00	1	100.00	0	0	2	1.36
Ne	61	84.72	11	15.28	63	86.30	10	13.70	145	98.64
<b>Makrolidi</b>										
Da	1	100.00	0	0	1	100.00	0	0	2	1.36
Ne	60	83.33	12	16.67	63	86.30	10	13.70	145	98.64
<b>Klindamicin</b>	3	75.00	1	25.00	4	66.67	2	33.33	10	6.80

Antibiotik primijenjen u prva 24 h od pojave sepse	<i>P. mirabilis</i> skupine								Ukupno pacijenata liječenih antibiotikom	
	MDRPM				OPM					
	Mikrobiološka eradikacija u periodu od 72 h od pojave sepse				Mikrobiološka eradikacija u periodu od 72 h od pojave sepse					
	Da		ne		da		ne			
	N	% eradikiran	N	% eradikiran	N	% eradikiran	N	% eradikiran		
<b>Da</b>										
<b>Ne</b>	58	84.06	11	15.94	60	88.24	8	11.76	137	93.20
<b>Glikopeptidi</b>										
<b>Da</b>	2	66.67	1	33.33	1	50.00	1	50.00	5	3.40
<b>Ne</b>	59	84.29	11	15.71	63	87.50	9	12.50	142	96.60
<b>Metronidazol</b>										
<b>Da</b>	3	75.00	1	25.00	4	100.00	0	0	8	5.44
<b>Ne</b>	58	84.06	11	15.94	60	85.71	10	14.29	139	94.56

**Tablica 14.** Omjer izgleda mikrobiološke eradikacije uz karbapeneme i bez karbapenema (za MDRPM skupinu)

Odds Ratio and Relative Risks			
	Value	95% Confidence Limits	
<b>Odds Ratio</b>	4.9565	1.2156	20.2105
<b>Relative Risk (Column 1)</b>	1.2895	1.0213	1.6281
<b>Relative Risk (Column 2)</b>	0.2602	0.0766	0.8831

**Tablica 15.** Omjer izgleda mikrobiološke eradikacije uz fluorokinolone i bez fluorokinolona (za MDRPM skupinu)

Odds Ratio and Relative Risks			
	Value	95% Confidence Limits	
<b>Odds Ratio</b>	0.1509	0.0390	0.5846
<b>Relative Risk (Column 1)</b>	0.6361	0.4009	1.0094
<b>Relative Risk (Column 2)</b>	4.2143	1.5975	11.1175

## 5. RASPRAVA

U ovoj studiji je analizirana pojava stečene ABL u kliničkim izolatima vrste *P. mirabilis*, koja uzrokuje konstitutivno izraženu rezistenciju na cefalosporine, i koja može biti prisutna u kombinaciji s drugim mehanizmima otpornosti na antimikrobne lijekove i time značajno smanjiti mogućnost izbora u liječenju infekcija uzrokovanih ovakvim izolatima. Studija također naglašava veliki potencijal klonskog širenja takvih sojeva u bolničkom okruženju. Također, istražena je statistička povezanost određenih rizičnih čimbenika koji mogu pogodovati nastanku sepse uzrokovane višestruko otpornim izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL. Uz to, ispitana je učinkovitost određenih antimikrobnih lijekova protiv ovakvih izolata *in vitro*, te je istraženo postoji li veća vjerojatnost neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja sepse uzrokovane takvim izolatima. Istraženo je i koji antimikrobni lijek ima najveću vjerojatnost mikrobiološke eradikacije tijekom 72 h od pojave znakova sepse u hemokulturama pacijenata sa sepsom uzrokovanom takvim izolatima.

U objavljenom znanstvenom radu, koji je dio ove doktorske disertacije, nalazi se prvo izvješće o CMY-16 tipu ABL u bolničkim izolatima vrste *P. mirabilis* u Hrvatskoj. Isti tip ABL opisan je u izolatima u Italiji i Grčkoj, stoga možemo pretpostaviti da je CMY-16 dominantan tip stečene ABL u ovoj vrsti u sjevernim dijelovima mediteranske regije (84, 86, 88, 89). U usporedbi s CMY-4 i CMY-12 varijantama enzima, koji su najbliži homolozi, CMY-16 se razlikuje u samo jednoj aminokiselini. Radi se o izmjenama A171S u slučaju CMY-4, i N363S u slučaju CMY-12, pa se pretpostavlja da se CMY-16 mogla lako razviti mutacijom neke od ove dvije varijante (112).

Rezultati molekularnih analiza iz ove studije definirali su smještaj *bla*<sub>CMY-16</sub> gena na kromosomu, prisutnost insercijskog elementa *ISEcp1*, te njegov položaj 110 pb uzvodno od početnog kodona *bla*<sub>CMY-16</sub>, što je također u skladu s rezultatima talijanskih i grčkih studija (84, 86, 88, 89). Kao što je već rečeno, *ISEcp1* ima ulogu u mobilizaciji i transpoziciji susjednih gena, i vjerojatno je igrao važnu ulogu u mobilizaciji *bla*<sub>CMY</sub> gena, budući da je često opisan u njihovoj blizini na 5' strani (46-48, 86).

Zanimljivi su rezultati usporedne analize reprezentativnih izolata vrste *P. mirabilis* s različitim *bla*<sub>CMY</sub> genima iz više različitih europskih zemalja, koju su napravili D'Andrea i suradnici (89). Prikazali su zapanjujuće sličnosti među izolatima, bez obzira na CMY varijantu ili zemljopisno i vremensko podrijetlo. Svima su se *bla*<sub>CMY</sub> geni nalazili u transpozicijskim modulima Tn6093, zajedno s *ISEcp1* elementom smještenim 110 pb uzvodno od gena,

fragmentom kromosoma *C. freundii*, i dijelom okosnice plazmida tipa *ColE1*. Također, transpozicijski modul Tn6093 je u svim izolatima bio integriran na isto mjesto na kromosomu (pepQ gen) (89). Ovi su podaci u skladu s hipotezom o mobilizaciji *bla<sub>CMY</sub>* gena kao jednom događaju u prošlosti, s *C. freundii* na *P. mirabilis*, koji je predak današnjih izolata. Po toj hipotezi, nakon ovakve ugradnje u kromosom dešavale su se i dešavaju se daljnje kontinuirane izmjene *bla<sub>CMY</sub>* gena, čime se stvaraju nove varijante (89). Iako naši reprezentativni izolati nisu bili uključeni u spomenutu studiju, na osnovu sličnosti s talijanskim izolatima koji su bili dio te studije, i koji također istovremeno sadrže *bla<sub>CMY-16</sub>* i *bla<sub>TEM-1</sub>*, možemo pretpostaviti da se i u našim izolatima vjerojatno nalazi isti transpozicijski modul.

Ispitivani izolati imali su konstitutivno izraženu otpornost na cefalosporine, pokazujući rast kolonija u potpunosti do diska za sve cefalosporine, osim za cefepim (na koji su pokazali različite razine osjetljivosti). Ovakav profil rezistencije mogao bi biti rezultat visoke razine ekspresije gena, što je u nekih enterobakterija rezultat promjene u *bla<sub>ampR</sub>* genu nastale zbog neuspjeha u prijenosu spomenutog gena, i/ili može biti posljedica prisutnosti stečenog *ISEcp1* elementa, budući da se ova sekvenca može umetnuti u AmpR-vezno mjesto uzvodno od *bla<sub>CMY</sub>* gena i osigurati promicanje visoke ekspresije *bla* gena (47-49). Dokaz insercije *ISEcp1* elementa smještenog 110 pb uzvodno od početnog kodona za *bla<sub>CMY-16</sub>* u izolatima iz ove studije ide u korist hipoteze o njegovom utjecaju na promicanje visoke ekspresije gena za CMY-16 ABL.

Visoka ekspresija gena objašnjava otpornost na treću generaciju cefalosporina, ali što se tiče otpornosti na cefepim, ona je češće rezultat lučenja ESBL enzima (113, 114). Budući da ESBL nije dokazana u ispitivanim izolatima, smanjena osjetljivost ili otpornost na cefepim koji su zabilježeni u dijelu izolata iz ove studije, mogli bi ukazivati na selekciju mutanata koje luče AmpC cefalosporinaze proširenog spektra (ESAC), enzime sa strukturnom modifikacijom u blizini aktivnog mjesta koja dovodi do proširenog spektra hidrolize (36, 37, 53). Pokazalo se da je dovoljna supstitucija samo jedne aminokiseline za povećanje katalitičkih svojstava enzima i proširenje spektra djelovanja i na 4. generaciju cefalosporina (37).

TEM-1 i TEM-2  $\beta$ -laktamaze, koje su dokazane u ispitivanim izolatima, nemaju utjecajnu ulogu u profilu rezistencije izolata koji luče ABL (115-117).

Konstitutivna ekspresija i visoka razina ekspresije AmpC enzima značajno smanjuju mogućnosti liječenja, posebno kad je to praćeno drugim mehanizmima rezistencije.

Ispitivanjem antimikrobnog rezistoma u višestruko otpornom izolatu *P. mirabilis* iz sjeverne Italije (IT NO-051/03), koji je također sadržavao gene *bla*<sub>CMY-16</sub> i *bla*<sub>TEM-1b</sub> i pokazivao isti profil rezistencije kao većina izolata ispitivanih u našoj studiji, D'Andrea i suradnici identificirali su gene otpornosti na aminoglikozide, kinolone, kloramfenikol, tetracikline, trimetoprim i sulfonamide (118). Ispitivanje prisutnosti spomenutih gena je bilo izvan opsega naše studije, ali bi bilo zanimljivo napraviti usporednu molekularnu analizu s ovim izolatom.

Zbog drastično smanjene mogućnosti inhibicije MDR sojeva vrste *P. mirabilis* radi njihovih intrinzičnih i stečenih mehanizama rezistencije, ostalo je svega nekoliko antimikrobnih lijekova na koje takvi sojevi još uvijek pokazuju osjetljivost u *in vitro* testiranju, ali za neke od njih ne postoje jasni stavovi o kliničkoj učinkovitosti u liječenju infekcija uzrokovanih takvim sojevima.

Jedna od mogućih opcija liječenja je piperacilin/tazobaktam, antimikrobna kombinacija na koju je 77% izolata iz ove studije bilo osjetljivo, a daljnjih 22% bilo je osjetljivo uz povećanu izloženost (Tablica 2). Kao što je spomenuto, još uvijek nema dovoljno studija koje pokazuju njegovu kliničku učinkovitost na sojevima s konstitutivno izraženom ekspresijom ili hiperekspresijom ABL. U studijama o njegovoj učinkovitosti na sojevima s inducibilnom ABL, rezultati nisu uniformni i ne daju jasne zaključke. Meta-analiza iz 2019. godine koju su napravili Cheng i suradnici sažela je rezultate 8 opservacijskih studija i nije pronašla značajnu razliku u smrtnosti između pacijenata liječenih piperacilin/tazobaktamom i karbapenemima za bakterijemiju uzrokovanu vrstama koje pripadaju ESCPM skupini (119). Međutim, postoji heterogenost u analiziranim studijama, i u dvije od njih 30-dnevna smrtnost među pacijentima liječenim piperacilin-tazobaktamom bila je brojčano viša nego među pacijentima liječenim karbapenemima (119). S druge strane, u opservacijskoj studiji na 103 bolesnika objavljenom 2021. godine, da Cunha Ferreira i suradnici su prikazali dvostruko veće izgleda za smrt unutar 30 dana u slučaju monoterapije piperacilinom/tazobaktamom, u usporedbi s alternativnim antimikrobnim lijekovima, u pacijenata s neoplazijom koji su razvili bakterijemiju uzrokovanu enterobakterijom koja luči ABL (120). Razvidna je potreba za daljnjim studijama kako bi se jasnije odredila uloga piperacilin/tazobaktama u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ABL, bilo inducibilno ili konstitutivno, pogotovo

imajući u vidu ograničenu inhibitornu sposobnost tazobaktama u zaštiti piperacilina od hidrolize AmpC enzimom.

Smjernice Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (engl. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; ESCMID) za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim gram-negativnim bacilima (potvrđene od Europskog društva za intenzivnu medicinu) iz 2022. godine spominju piperacilin/tazobaktam u kontekstu liječenja niskorizičnih, lakih infekcija uzrokovanih bakterijama rezistentnim na 3. generaciju cefalosporina, dok za bolesnike se bakterijemijom i teškim infekcijama preporučuju karbapeneme (121).

Smjernice Američkog društva za infektivne bolesti (engl. *The Infectious Diseases Society of America*; IDSA) za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim gram-negativnim bacilima iz 2023. godine ne preporučuju piperacilin/tazobaktam u liječenju ozbiljnih infekcija uzrokovanih enterobakterijama s umjerenim do visokim rizikom za inducibilno lučenje ABL, dok može biti razumna opcija u liječenju blagih infekcija (122).

Uz to, rezultati naše studije u kojima, prema smjernicama EUCAST-a za interpretaciju osjetljivosti, 22% izolata zahtijeva liječenje uz povećanu izloženost antimikrobnom lijeku (interpretacija I), također ukazuju na potrebu opreznog razmatranja ove opcije antimikrobnog liječenja dok se ne provedu dodatna istraživanja.

Što se tiče ostalih antimikrobnih lijekova testiranih u ovoj studiji, ceftolozan/tazobaktam pokazuje varijabilnu *in vitro* aktivnost protiv enterobakterija koje luče ABL (73, 74). Slično našoj studiji u kojoj se samo 15% izolata pokazalo osjetljivima, Robin i suradnici su u samo 19% izolata vrste *Enterobacter cloacae* imali osjetljive rezultate *in vitro* (123). Zbog manje učinkovitosti tazobaktama u zaštiti  $\beta$ -laktama od hidrolize AmpC enzimom u usporedbi s novijim inhibitorima  $\beta$ -laktamaze, te nejasne aktivnosti ceftolozana protiv enterobakterija s umjerenim do visokim rizikom za klinički značajno lučenje ABL, ne preporučuje se korištenje ovog antibiotika u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL (63, 121).

S druge strane, ceftazidim/avibaktam je pokazao apsolutnu *in vitro* učinkovitost u ovoj studiji (100%), i potvrdio svoje mjesto kao dobra alternativa karbapenemima u liječenju infekcija uzrokovanih ovakvim sojevima (63, 75). Ipak, budući da ovaj lijek može biti zadnji

izbor u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama rezistentnim na karbapeneme, preporučuje se sačuvati njegovu primjenu za takve situacije gdje je prijeko potreban. Eventualna pojava otpornosti na ceftazidim/avibaktam bi se trebala pažljivo pratiti. Kao što je već spomenuto, opisana je nova varijanta CMY gena *bla*<sub>CMY-172</sub>, povezana s visokom razinom otpornosti na ceftazidim/avibaktam i to u soju *K. pneumoniae* koji istovremeno luči KPC karbapenemazu (76). Pretpostavlja se da je otpornost posljedica delecije aminokiselina (L290\_V291\_A292del) u R2 petlji, zajedno sa zamjenom aminokiselina na poziciji 346 (Asn<sup>346</sup>Ile). Također, opisana je i nova varijanta CMY-178, koja dovodi do visoke razine otpornosti na ceftazidim/avibaktam u MDR soju *E. coli* (77). Ovaj soj, uz gore spomenute izmjene opisane u CMY-172 varijanti, sadrži dodatno i supstituciju Asn70Thr, što u konačnici dovodi do još brže hidrolize i više razine otpornosti nego što to čini CMY-172. Zanimljivo je spomenuti rad u kojem su Niu i suradnici opisali mutaciju na genu za CMY-16, dakle istu varijantu ABL opisanu u izolatima *P. mirabilis* iz ove studije, a koja je dovela do rezistencije na aztreonam/avibaktam soja *K. pneumoniae* (124). Mutacije u *bla*<sub>CMY-16</sub> genu (Tyr150Ser ili Asn346His) dovele su do smanjenog afiniteta vezanja avibaktama. Ovaj soj je ujedno sadržavao gene za CTX-M ESBL, te NDM-1 i OXA-48 karbapenemaze.

Kao što je spomenuto, otpornost na cefepim je najčešće rezultat lučenja ESBL enzima (113, 114). Izolati koji pokazuju više vrijednosti MIK-a za cefepim mogu imati veću vjerojatnost istovremenog lučenja ESBL, iako u nedostatku dokaza gena za ESBL treba uzeti u obzir i mutacije koje dovode do pojave ESAC enzima (36, 37, 53). Preporuke BSAC-a imaju jasan stav za uporabu cefepima u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ESBL ili ABL. Cefepim se preporučuje samo ako je njegova minimalna inhibitorna koncentracija  $\leq 1$  mg/L, i to uz primjenu na optimiziran način (produljena infuzija), i strogo su protiv uporabe ako je MIK 2–4 mg/L (kategorija umjereno osjetljivo prema EUCAST-u), kao i ako postoji istovremeno lučenje ABL i ESBL. (63). Pozivaju se, među ostalim, na retrospektivnu studiju koju su napravili Lee i suradnici, a koja je provedena na 305 pacijenata s bakterijemijom koju uzrokuje *E. cloacae* (61). Uspoređeni su ishodi u pacijenata liječenih *in vitro* aktivnim cefepimom (slučajevi) i oni liječeni karbapenemom (kontrole). U multivarijantnoj analizi, studija je pokazala neovisnu povezanost smrtnosti u periodu od 30 dana sa, između ostalog, infekcijama koje uzrokuju izolati s istovremenim lučenjem ESBL i ABL enzima, te infekcijama uzrokovanim izolatima koji su imali vrijednosti MIK-a za cefepim



od 4 - 8 mg/L. Štoviše, oni kojima je bakterijemija bila uzrokovana izolatima s takvim vrijednostima MIK-a, stopa smrtnosti nije smanjena čak ni kada su liječeni visokim dozama cefepima (2 g svakih 8 h iv). S druge strane, IDSA smatra cefepim poželjnom opcijom u liječenju infekcija koje uzrokuju *E. cloacae*, *K. aerogenes* i *C. freundii*, jer u literaturi ne postoje jasni dokazi kliničkog neuspjeha u liječenju enterobakterija koje luče ABL, iako su svjesni nedostupnosti kliničkih ispitivanja koja uspoređuju kliničke ishode liječenja cefepimom u odnosu na karbapeneme u pacijenata s infekcijama uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL (122). Osvrću se, među ostalim, na sustavni pregled s meta-analizom u kojeg je bilo uključeno 11 opservacijskih studija, gdje se uspoređuju klinički ishodi pacijenata koji su primali cefepim u odnosu na karbapeneme za bakterijemije uzrokovane vrstama *Enterobacter*, *Citrobacter* i *Serratia* (64). Meta-analiza nije otkrila razlike u kliničkim ishodima između ovih režima liječenja, s tim što postoje ograničenja dostupnih podataka i značajna heterogenost između studija (64). Međutim, ni IDSA ne smatra cefepim optimalnim izborom u liječenju infekcija s istovremenim lučenjem ABL i ESBL, i zbog toga naglašavaju oprez ako je MIK cefepima od 4 do 8 mg/L zbog veće vjerojatnosti koprodukcije enzima, pozivajući se također na studiju koju su proveli Lee i suradnici (61, 122). Slično tome, smjernice ESCMID-a navode opservacijske studije u kojima su procijenjeni učinci cefepima i karbapenema, i dokaz većeg mortaliteta infekcija uzrokovanih enterobakterijama s istovremenim lučenjem ABL i ESBL ako su liječene cefepimom, ali bez razlike u ishodima u studijama koje su se bavile enterobakterijama koje luče samo ABL (60-62, 125-128). No i ESCMID se ograđuje navodeći kako je većina studija bila izložena visokom riziku od pristranosti, pa obzirom na ozbiljne nedosljednosti postoji vrlo niska sigurnost dokaza o nepostojanju razlike između cefepima i karbapenema ili o inferiornosti cefepima s visokim vrijednostima MIK-a u usporedbi s karbapenemima (121).

Iz svega navedenog, neupitna je potreba za daljnjim istraživanjima, prvenstveno kliničkim, radi jasnoće situacija kada se cefepim može sa sigurnošću primijeniti u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ABL, i to ne samo inducibilno nego i konstitutivno. U ovoj studiji, MIK<sub>50%</sub> za cefepim je 3 mg/L, MIK<sub>90%</sub> je 8 mg/L, a raspon vrijednosti MIK-a je od 0,75 do čak 32 mg/L. Budući da je isključena istovremena prisutnost ESBL i ABL, potrebna su daljnja istraživanja koja bi razjasnila pozadinu uzroka viših vrijednosti MIK-a u ovim izolatima, uključujući i mogućnost mutacije koja je dovela do pojave ESAC-a.

Svakako, izbor cefepima u liječenju ozbiljnih infekcija uzrokovanih ovakvim sojevima trebao bi se procijeniti s velikim oprezom, i uz obvezno prethodno određivanje vrijednosti MIK-a u okviru mikrobiološke dijagnostike.

Obzirom na globalan problem razvoja otpornosti na karbapeneme, strategije liječenja kojima se štedi uporaba karbapenema trebale bi biti prioritet, ukoliko postoje alternativni lijekovi s dokazima koji podupiru njihovu sigurnost i učinkovitost. Stoga su u ovoj studiji kao moguće alternative karbapenemima u testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove uključeni temocilin i fosfomicin, i oba lijeka su pokazala 100%-tnu *in vitro* aktivnost.

Iako je poznata aktivnost temocilina protiv enterobakterija koje luče različite tipove ESBL, kao i onih koje inducibilno ili konstitutivno luče ABL, prema trenutnim saznanjima, ovaj uskospektralni antibiotik registriran je za intravensku uporabu samo u Belgiji, Francuskoj, Njemačkoj, Luksemburgu i Velikoj Britaniji, i to za liječenje septikemije i infekcija urinarnog, te donjeg dišnog sustava uzrokovanih enterobakterijama (41, 63, 78, 79). Osmišljen je prije više od 40 godina, ali je njegova uporaba bila uglavnom zanemarena prvenstveno zbog slabe aktivnosti prema nefermentativnim bakterijama kao što su *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (78, 79). Nije učinkovit ni protiv bakterija s karbapenemazama iz skupine tzv. metalo- $\beta$ -laktamaza, ni onih s OXA-48, ali zadržava potencijalnu stabilnost prema KPC karbapenemazi (129, 130). Tumačenje osjetljivosti bakterija na temocilin u dosadašnjim studijama bilo je prilično otežano time što do 2021. godine u EUCAST smjernicama nisu postojali interpretacijski kriteriji za ovaj antibiotik, a nakon te godine postoje samo za *E. coli*, vrste roda *Klebsiella* (osim *K. aerogenes*) i *P. mirabilis* (72). Interpretiraju ga isključivo kao umjereno osjetljivog, s preporukom doze od 2 g iv dva puta dnevno za nekomplikirane mokraćne infekcije i 2 g iv tri puta dnevno za infekcije s porijeklom iz mokraćnog sustava (72).

Prije 2021. godine, jedini dostupni interpretacijski kriteriji za osjetljivost enterobakterija na temocilin su bili oni koje je objavio BSAC, i oni su korišteni u ovoj studiji (110). BSAC se ne ograničava samo na infekcije mokraćnog sustava, već pruža mogućnost tumačenja i za sustavne infekcije. Prema njima, bakterije s vrijednostima MIK-a  $\leq 32$  mg/L smatraju se osjetljivima za infekcije mokraćnog sustava, dok su one koje imaju MIK  $\leq 8$  mg/L osjetljive u sustavnim infekcijama (110). Upravo zbog ovih različitih tumačenja osjetljivosti, u infekcijama uzrokovanim enterobakterijama koje luče KPC smatra se sigurnim koristiti

temocilin samo kada su u pitanju infekcije mokraćnog sustava dok se ne provedu daljnje kliničke studije, jer te bakterije uobičajeno imaju nešto viši MIK (63, 130).

Što se tiče enterobakterija koje luče ESBL i /ili ABL, BSAC preporučuje temocilin kao učinkovit i dobro podnošljiv lijek za infekcije mokraćnog sustava, također uz preporučenu dozu od 2 g iv dva puta dnevno (63). Za liječenje sustavnih infekcija smatraju poželjnim ili doziranje tri puta dnevno ili primjenu kontinuirane infuzije, te naglašavaju potrebu za dodatnim kliničkim istraživanjima vezanim uz režime doziranja (63).

Smjernice ESCMID-a za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim gram-negativnim bacilima za sada spominju temocilin samo kao potencijalnu zamjenu karbapenemima u liječenju kompliciranih mokraćnih infekcija kojima su uzročnici enterobakterije otporne na 3. generaciju cefalosporina, ali s vrlo niskom sigurnošću dokaza. Pri tome spominju retrospektivnu multicentričnu studiju slučajeva i kontrola, koju su 2021. godine objavili Delory i suradnici, u kojoj su se uspoređivali slučajevi koji su primali temocilin  $\geq 50\%$  efektivnog trajanja antibiotskog liječenja, i kontrole koje su primale isključivo karbapenem (131). Među bakterijama koje su uzrokovale komplicirane mokraćne infekcije iz ove studije i lučile su ESBL, 17% izolata je pripadao vrsti *Enterobacter*. Kliničko izlječenje je zabilježeno u 94% slučajeva i 99% kontrola, bez razlike među imunokompromitiranim pacijentima i pacijentima s transplantiranim bubregom. Međutim, podcrtavaju nisku sigurnost dokaza jer su u studiji postojale značajne razlike među skupinama koje nisu bile prilagođene, a intervali pouzdanosti su bili veliki.

Do danas nije objavljena komparativna klinička studija između temocilina i karbapenema ili drugih antibiotika u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje luče ESBL ili ABL. Nedostatak dovoljnog broja kvalitetnih studija onemogućuje sigurnu preporuku ovog antibiotika u liječenju infekcija drugih sustava, iako je pokazao odličnu penetraciju u peritonealnu tekućinu i uspjeh u liječenju intraabdominalnih infekcija, kao i uspješno liječenje cervikalnog epiduralnog apscesa i apscesa mišića, ali na razini prikaza slučaja (132-134). Prednost mu je također što uski spektar djelovanja pošteduje mikrobiom crijeva, a uočena je i značajno manja incidencija proljeva koje uzrokuje *Clostridium difficile* (135, 136).

Izvrсни rezultati iz naše studije koji pokazuju 100%-tnu osjetljivost MDR izolata *P. mirabilis* koji konstitutivno luče ABL na temocilin, iako su odraz *in vitro* testiranja, trebali bi podići svijest o mogućoj uporabi temocilina u Hrvatskoj i drugim europskim zemljama za one indikacije za koje postoje smjernice odgovarajućeg društva, pogotovo uzimajući u obzir i njegovu učinkovitost na mokraćne infekcije izazvane izolatima s KPC karbapenemazom. Također, nadamo se da će ovi rezultati potaknuti daljnja istraživanja njegove učinkovitosti na infekcije ostalih sustava, kao i optimizacije doze ovisno o indikaciji, kako bi se iskoristio potencijal koji ovaj antibiotik ima u upravljanju antimikrobnim lijekovima kao zamjena za karbapeneme.

Fosfomicin je također pokazao izvrsne rezultate u ovoj studiji, međutim, prema preporukama EUCAST-a od studenog 2023. godine, njegova uporaba u monoterapiji se više ne podupire za sve indikacije osim infekcija s porijeklom u mokraćnom sustavu, i to samo za bakteriju *E. coli*, dok to ne bude potkrijepljeno s više kliničkih dokaza (137). Iste preporuke navode kako, među ostalim enterobakterijama, za sada mogu jedino za *P. mirabilis* prikazati dobre epidemiološke granične vrijednosti (engl. *epidemiological cut-off values*; ECOFFs), ali također još uvijek nema dovoljno kliničkih podataka koji bi omogućili interpretacijske kriterije. Nadalje, navodi se kako korištenju fosfomicina u kombiniranom liječenju raznih infekcija također za sada nije moguće procijeniti vrijednost bez dodatnih kliničkih studija (137). Za sada i ESCMID i BSAC gledaju na fosfomicin u liječenju sustavnih infekcija uzrokovanih MDR gram-negativnim bakterijama kao na „terapiju spašavanja“ (engl. *salvage therapy*), kada za to ne postoje druge terapijske mogućnosti (63, 121). Neke studije su pokazale kako intravenski fosfomicin, kada se koristi u kombiniranoj terapiji, može biti učinkovit u takvim infekcijama, vjerojatno zbog svog mehanizma djelovanja kojim nepovratno inhibira ranu fazu sinteze stanične stijenke bakterija, što djeluje sinergistički s mehanizmima djelovanja drugih antimikrobnih lijekova (138, 139).

U svijetlu mogućnosti kombinirane terapije, zanimljiva je studija koju su proveli Berleur i suradnici, u kojoj su opisali zajedničku aktivnost fosfomicina i temocilina *in vitro* i *in vivo* u modelu mišjeg peritonitisa na sojeve *E. coli* koji luče karbapenemaze tipa KPC-3 ili OXA-48 (140). Ova kombinacija spriječila je pojavu rezistencije na fosfomicin, i pokazala se baktericidnijom od samog fosfomicina (140). Ipak, većinu retrospektivnih i prospektivnih studija na ljudima u kojima su pacijenti istodobno primali različite antimikrobne lijekove

teško je tumačiti, što je razlog zbog kojeg nema jasnih smjernica o dobrobiti istovremene primjene fosfomicina, iako su zabilježena čak i klinička poboljšanja uvođenjem kombinirane terapije unatoč *in vitro* rezistenciji na fosfomicin, kao u slučaju nekih infekcija kojima je uzročnik bio *P. aeruginosa* (81).

Osim FOREST studije koja je uspoređivala učinkovitost fosfomicina u liječenju infekcija mokraćnog sustava s bakterijemijom i MDR *E. coli* kao uzročnikom, gdje fosfomicin nije bio inferioran u usporedbi s piperacilin/tazobaktamom, nedostaju dobro osmišljene randomizirane kontrolirane studije usporedbe fosfomicina i drugih opcija antimikrobnog liječenja (141). U iščekivanju novih studija i dokaza, 100%-tna osjetljivost MDR izolata *P. mirabilis* iz ove studije bi mogla pružiti motiv za razmatranje fosfomicina kao dodatka u kombiniranoj terapiji za infekcije ovakvim izolatima kod kojih nema optimalnijeg rješenja ili je potrebno pojačati baktericidan učinak antimikrobnog liječenja.

Kao što je razvidno iz rezultata studije i dosadašnje rasprave, u liječenju složenih infekcija uzrokovanih MDR izolatima *P. mirabilis* koji konstitutivno luče ABL, uz izuzetak ceftazidim/avibaktama kojeg uobičajeno čuvamo za infekcije uzrokovanim enterobakterijama koje luče karbapenemaze, nedvojbenu sigurnost u liječenju za sada pružaju jedino karbapenemi, odnosno meropenem i ertapenem. Na *in vitro* dokazanu 100%-tnu osjetljivost izolata na meropenem i ertapenem, naslanjaju se klinički rezultati iz drugog dijela studije gdje je u skupini pacijenata sa sepsom koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, uspjeh mikrobiološke eradikacije u vremenu od 72 h od pojave znakova sepse bio 5 puta veći za one pacijente koji su u prvih 24 h empirijski liječeni karbapenemima (OR, 4,96; 95% CI, 1,22 – 20,21).

Vrijedno je spomenuti još jednom intrinzičnu otpornost vrste *Proteus* na tigeciklin i kolistin, antibiotike koji se obično ostavljaju kao posljednje sredstvo u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim MDR bakterijama. Moguće je da je upravo selektivni pritisak kolistina, koji se u to vrijeme učestalo primjenjivao u KBC Split zbog infekcija uzrokovanih također MDR patogenom *A. baumannii*, imao određenu ulogu u pojavi ove epidemije kojoj pripadaju analizirani izolati. Eventualno daljnje stjecanje rezistencije na karbapeneme moglo bi učiniti MDR *P. mirabilis* vrlo ozbiljnim problemom u liječenju infekcija povezanih s bolničkom skrbi, a u slučaju stjecanja metalo- $\beta$ -laktamaze, izgubio bi se i jedini preostali siguran izbor u liječenju, ceftazidim/avibaktam. Uz to su, kao što je već spomenuto,

zabilježeni slučajevi enterobakterija s CMY-tipovima ABL u kojih se razvila rezistencija na ceftazidim/avibaktam (76, 77, 124).

Klonska priroda analiziranih izolata prikazana u ovoj studiji ukazuje na visok epidemijski potencijal ovakvih sojeva. Brza identifikacija i kombinacija odgovarajućih mjera kontrole infekcija moraju biti kamen temeljac u borbi protiv njihovog širenja. Također, aktivni nadzor i praćenje u bolnicama, kao i ustanovama za dugotrajnu skrb, omogućuju brzu reakciju u slučaju pojave njihovog izbijanja. Ne manje važna je i racionalna uporaba antibiotika, jer izbjegavanjem nepotrebne uporabe antimikrobnih lijekova širokog spektra smanjuje se selektivni pritisak koji dovodi do razvoja otpornosti.

S druge strane, pojava plazmidom posredovane cefalosporinaze u vrsti *P. mirabilis*, koja ih intrinzično nema, povećava neizvjesnost u izboru prikladnog empirijskog antimikrobnog liječenja infekcija uzrokovanih ovom vrstom. Ispravna i pravovremena karakterizacija tipa rezistencije važan je preduvjet za izbor učinkovitog antimikrobnog lijeka. Poznata je povezanost između neprimjerene i/ili odgođene antibiotske terapije ozbiljnih infekcija poput sepse, i produženog bolničkog liječenja, a samim tim i troškova zdravstvene skrbi (98-100). Na žalost, postoji povezanost i s povećanom stopom smrtnosti (198-100).

Izbor empirijske antimikrobne terapije određuje se, pored ostalih čimbenika, procjenom mogućeg uzročnika na temelju epidemioloških i kliničkih čimbenika i čimbenika rizika domaćina (98). Stoga je ova studija također imala za cilj ispitati povezanost demografskih, epidemioloških i kliničkih podataka pacijenata koji bi mogli biti povezani s pojavom sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, i koji bi mogli poslužiti kao prediktivni pokazatelj. Poznavanje i uočavanje povezanih čimbenika trebalo bi podići svjesnost o potrebi uvođenja empirijskog antimikrobnog lijeka drugačijeg od onog koji spada u prvi izbor empirijskog liječenja.

Zanimljiva zapažanja dobivena univarijantnom opisnom statistikom pokazala su da su podjednako zahvaćena oba spola, i da je dob podjednaka u obje skupine, s tim da je to pretežito starija životna dob (Tablica 3). Mokraćni sustav je najučestaliji izvor infekcija u obje skupine, što je očekivano obzirom na činjenicu da je *P. mirabilis* važan uropatogen. Postotak pacijenata pristiglih iz staračkog doma se neznatno razlikuje među grupama, s nešto većim brojem u MDRPM skupini.

I univarijantne opisne statistike i bivarijatna analiza asocijacija kategorijskih varijabli ističu značajnu povezanost bolničke infekcije, prethodne hospitalizacije, prethodne antimikrobne terapije, potom COVID-19 infekcije u trenutku sepse ili preboljelog težeg oblika nedavno, te teške traume, sa skupinom bolesnika kojima je uzročnik sepse bio MDR *P. mirabilis*.

Sustavni pregled literature objavljen u 2024. godini kojeg su napravili Granata i Cicalini, ukazuje na visoke stope bolničkih infekcija zabilježene među pacijentima s COVID-19 infekcijom, u rasponu između 7,5 i 37,7%, te zabrinjavajuće stope rezistencije na antibiotike (142). To se povezuje s činjenicom što su ovakvi pacijenti često zahtijevali produženi boravak u bolnici i potrebu za invazivnim postupcima, što povećava rizik od razvoja bakterijskih infekcija stečenih u bolnici, i što je primijećeno i među pacijentima s COVID-19 infekcijom iz naše studije. Na sličan način bi se mogla objasniti povezanost pacijenata s težom traumom i sepse koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, jer su i takvi pacijenti zahtijevali produženi boravak u bolnici i prolazili invazivne postupke. Također, gore navedeni sustavni pregled navodi uporabu antibiotika u pacijenata s COVID-19 infekcijom u rasponu od 12% do čak 83%, unatoč tome što je samo mali postotak pacijenata imao dokumentiranu bakterijsku infekciju, što je moglo igrati ulogu u progresiji bakterijskih infekcija uzrokovanih MDR sojevima.

U rezultatima logističke regresijske analize naše studije, pokazalo se da je izgled za sepsu koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* 2.64 puta veći za pacijente sa bolničkom infekcijom, a 3.61 puta veći za pacijente koji su primali antimikrobnu terapiju u trajanju od 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca. Čak 6.2 puta je veći izgled da je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* u onih pacijenata koji su bili hospitalizirani 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci.

Pojava sepse koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* pretežito kao bolničke infekcije dodatno podiže svjesnost o potencijalu širenja ovakvih sojeva u bolničkom okruženju. Prethodna hospitalizacija dobro je poznat čimbenik rizika za kolonizaciju i infekciju MDR sojevima vrste *P. mirabilis* (143, 144). U istraživanju slučajeva i kontrola kojeg su proveli Tumbarello i suradnici radi utvrđivanja rizičnih čimbenika za stjecanje infekcije krvotoka uzrokovane MDR sojevima *P. mirabilis*, te ishoda takvih infekcija, također je uočena povezanost s prethodnom hospitalizacijom i prethodnom primjenom antimikrobne terapije kao i u našoj studiji (144). Uz to su dokazali povezanost i s prijemom iz ustanove za dugotrajnu njegu, te urinarnom kateterizacijom. Bolesnici kojima je infekcija krvotoka bila uzrokovana MDR sojem češće su

dobili neadekvatnu početnu antimikrobnu terapiju, nego oni kojima je infekcija bila uzrokovana osjetljivim sojem (144). Štoviše, Tumbarello i suradnici su dokazali da je 21-dnevna smrtnost bila je povezana sa septičkim šokom, MDR izolatima *P. mirabilis*, i neprimjerenom empirijskom antimikrobnom terapijom, te naglašavaju važnost smanjenja rizika neprimjerene terapije kao jedinog promjenjivog čimbenika rizika za smrtnost u ovim slučajevima. Također su pronašli povezanost infekcija krvotoka koje uzrokuje MDR *P. mirabilis* i produžene hospitalizacije takvih pacijenata.

U našoj studiji, duže od 10 dana je bilo hospitalizirano 60% pacijenata iz MDRPM skupine, u odnosu na 43% pacijenata iz OPM skupine. Boravak u bolnici od pet dana ili kraće, imalo je 14% pacijenata iz MDRPM skupine i 26% pacijenata iz OPM skupine. Nisu rađene preciznije statističke procjene povezanosti MDR izolata *P. mirabilis* i dužine hospitalizacije, ali čini se da bi mogla postojati određena povezanost takvih izolata i dužeg trajanja bolničkog liječenja.

Iako je u našoj studiji, za razliku od studije koju su proveli Tumbarello i suradnici, uočena tek neznatna razlika među skupinama vezana uz prijem iz staračkog doma, poznato je da su takvi pacijenti skloni češćim hospitalizacijama, gdje onda lako mogu biti kolonizirani MDR sojevima bakterija. Dugotrajni nositelji bliskim kontaktom mogu prenijeti patogene drugim ljudima, ne samo u bolničkim nego i vanbolničkim okruženjima (145), a to posebnu implikaciju ima upravo za korisnike domova za starije i nemoćne osobe (87, 146). Prethodna primjena antimikrobne terapije također je dokazani čimbenik rizika za kolonizaciju pacijenata rezistentnim mikroorganizmima (143, 147).

Uočavanje spomenutih rizičnih čimbenika u trenutku prijema pacijenata, odnosno korištenje odgovarajućeg upitnika za procjenu rizika, moglo bi selektirati skupinu pacijenata koji se potom mogu preventivno podvrgnuti odgovarajućim mjerama kontrole bolničkih infekcija, i kojima je primjena empirijske antimikrobne terapije šireg spektra vrlo vjerojatno od koristi u preživljenju, te trajanju i troškovima bolničkog liječenja. Konvencionalne mjere koje se uobičajeno koriste za detekciju kolonizacije pacijenata MDR sojevima, poput nadzornih kultura, još uvijek zahtijevaju određeno vrijeme do konačnih rezultata. Ovakvom procjenom rizika, mogu se provesti odgovarajuće akcije i prije dobivanja rezultata nadzornih kultura.



Većano uz izvanbolničke infekcije uzrokovane MDR bakterijama, zanimljiv je sustav bodovanja kojeg su osmislili Tumbarello i suradnici radi identifikacije pacijenata koji pri prijemu u bolnicu imaju enterobakteriju koja luči ESBL (148). Retrospektivnom analizom podataka 849 odraslih pacijenata, logističkom regresijom dobili su model rizičnih varijabli, koji je potom ispitan u drugoj velikoj kohorti odabranoj prema identičnim kriterijima. Model se sastojao od šest varijabli: hospitalizacije u zadnjih godinu dana od prijema, premještaja iz druge zdravstvene ustanove, Charlsonovog komorbiditeta, liječenja  $\beta$ -laktamima i/ili fluorokinolonima u prethodna tri mjeseca, nedavne urinarne kateterizacije i dobi od  $\geq 70$  godina, i pouzdano je identificirao pacijente za koje je vjerojatno da imaju enterobakterije koje luče ESBL pri prijemu u bolnicu, a kojima će možda trebati posebne mjere kontrole infekcije i propisivanje drugačije empirijske antibiotske terapije (148). Slično tome, rezultati naše studije bi mogli doprinijeti osmišljavanju sustava bodovanja za identifikaciju pacijenata s MDR enterobakterijama poput ove iz studije, jer stratifikacija pacijenata na temelju njihovog rizika može značajno poboljšati preventivne i terapijske odluke. Nedavno je objavljen sustavni pregled i meta-analiza gdje su Timbrook i Fowler proučili literaturu koja se odnosi na modele predviđanja kliničkog rizika za pacijente kojima su uzročnici infekcija krvotoka enterobakterije koje luče ESBL ili karbapenemaze (149). Identificirali su 10 relevantnih studija, od kojih je 9 bilo usmjereno na rizik za ESBL, a samo jedna na rizik za karbapenemaze. Svi modeli su pokazali određena ograničenja i zaključuje se da je potrebna evaluacija ovih, kao i budućih modela radi jačanja učinkovitosti takvih pristupa i njihovog utjecaja na ishode pacijenata (149). Stoga opće prihvaćenog modela još uvijek nema, dok se većina zdravstvenih ustanova drži svojih lokalnih smjernica za procjenu rizika od infekcija uzrokovanih takvim sojevima.

Što se tiče empirijske antimikrobne terapije u slučaju sepse koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, iz rezultata univarijatne opisne statistike je razvidno da ona nije bila primjerena u 26% pacijenata iz MDRPM skupine, dok nitko u OPM skupini nije imao neprimjerenu terapiju (Tablica 9). Iako uz ovakve rezultate logistička regresija ima mogućnost velike pogreške i široki interval pouzdanosti, ipak se izračunala vjerojatnost neprimjerene empirijske terapije od 0.36 za MDRPM skupinu i 0.007 za OPM skupinu.

Poznato je da u slučajevima sepse uzrokovane sojevima *P. mirabilis* koji luče ESBL, postoji veća vjerojatnost neuspjeha liječenja i smrti pacijenta zbog neprimjerenog

antimikrobnog liječenja (144). Lako je pretpostaviti da je empirijsko liječenje infekcija MDR sojevima još izazovnije, i da neprimjeren izbor također negativno utječe na kliničke ishode, osobito u ranjivim skupinama pacijenata (99, 143, 150). Obzirom na složenost mehanizama rezistencije u slučaju izolata analiziranih u ovoj studiji, može se desiti neuspjeh liječenja čak i u slučaju primjene nekih antibiotika koji inače pripadaju onima širokog spektra djelovanja. Upravo zato je važno brzo i egzaktno odrediti sve relevantne mehanizme otpornosti bakterija, i prema njima izabrati najoptimalnije antimikrobno rješenje. Važno je spomenuti i da se, prema posljednjim smjernicama u liječenju septičnih bolesnika (Surviving Sepsis Campaign Guidelines 2021), preporučuje istovremeno primijeniti dva učinkovita antimikrobna lijeka protiv istog uzročnika (151).

Gledajući uspjeh mikrobiološke eradikacije u uzrocima hemokulture u skupini pacijenata sa sepsom koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* u periodu od 72 h od pojave znakova sepse, uspjeh je bio 5 puta veći za one pacijente koji su u prvih 24 h empirijski liječeni karbapenemima, a 6.7 puta manji ako su liječeni fluorokinolonima. Navedeni rezultati se uklapaju u preporuku o karbapenemima kao najboljem izboru u liječenju infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama koje luče ABL (9, 63, 64). Kako još uvijek nema dovoljno studija koje pružaju čvrste dokaze o sigurnom izboru alternativnog lijeka u empirijskoj ili konačnoj terapiji MDR enterobakterija koje luče ABL, s izuzetkom ceftazidim/avibaktama čiju uporabu treba čuvati za karbapenem-rezistentne gram-negativne bakterije, rezultati naše studije podupiru stajalište prema kojem karbapenemi za sada ostaju najbolji izbor u liječenju ozbiljnih infekcija uzrokovanih ovakvim izolatima.

## 6. ZAKLJUČCI

- Ova studija dokazala je fenotipskim i genotipskim testovima pojavu stečene ABL u kliničkim izolatima vrste *P. mirabilis*.
- Sekvenciranjem je utvrđeno da se radi CMY-16 tipu ABL, za kojeg u usporedbi s ostalim studijama možemo pretpostaviti da je dominantan tip stečene ABL u ovoj vrsti u sjevernim dijelovima mediteranske regije.
- Dokazan je smještaj *bla*<sub>CMY-16</sub> gena na kromosomu, kao i prisutnost insercijskog elementa *ISEcp1*, te njegov položaj 110 pb uzvodno od početnog kodona *bla*<sub>CMY-16</sub>. Prisutnost i položaj *ISEcp1* može se povezati s ugradnjom gena u kromosom i konstitutivnom ekspresijom ABL.
- Metode molekularne epidemiologije utvrdile su klonsku prirodu izolata i time naglasile veliki potencijal klonskog širenja takvih sojeva u bolničkom okruženju.
- Ispitivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove disk difuzijom pokazalo je otpornost na amoksicilin, kako sam tako i u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, trimetoprim-sulfametoksazol, i sve testirane cefalosporine osim cefepima. Svi osim jednog bili su otporni na kinolone, a velika većina i na sve aminoglikozide. Zadržali su osjetljivost na karbapeneme, te djelomično na piperacilin/tazobaktam i cefepim.
- U testiranju gradijent testovima, 77% izolata bilo S, i 22% I na piperacilin/tazobaktam, dok je 4% bilo S, a 68% I na cefepim. Svi izolati su bili potpuno osjetljivi na meropenem i ertapenem, dok je 89,0% izolata bilo S, a 11,0% I na imipenem. Rezultati testiranja pokazali su 100%-tnu *in vitro* učinkovitost ceftazidim/avibaktama, temocilina, i fosfomicina. Nasuprot tome, samo 15% izolata je bilo S na ceftolozan/tazobaktam.
- Izgled za sepsu koju uzrokuje MDR *P. mirabilis* 2.64 puta je veći za pacijente sa bolničkom infekcijom, a 3.61 puta veći za pacijente koji su primali antimikrobnu terapiju u trajanju od 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca. Čak 6.2 puta je veći izgled da je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis* u onih pacijenata koji su bili hospitalizirani 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci.
- Empirijska antimikrobna terapija u prvih 24 h od nastanka sepse nije bila primjerena u 26% pacijenata u skupini pacijenata sa sepsom koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, dok nitko u skupini sa sepsom koju uzrokuje osjetljivi *P. mirabilis* nije imao neprimjerenu

empirijsku terapiju. Procijenjene vjerojatnosti neprimjerene empirijske terapije iznose 0.36 za MDRPM skupinu i 0.007 za OPM skupinu.

- U skupini pacijenata sa sepsom koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, uspjeh mikrobiološke eradikacije u periodu od 72 h od pojave sepse je bio 5 puta veći za one pacijente koji su u prvih 24 h empirijski liječeni karbapenemima, a 6.7 puta manji ako su liječeni fluorokinolonima. Navedeni rezultati se uklapaju u preporuku o karbapenemima kao najboljem izboru u liječenju infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama koje luče ABL.
- Ispravna procjena rizičnih čimbenika u trenutku prijema pacijenata može selektirati skupinu pacijenata kojoj bi moglo biti korisno primijeniti odgovarajuće mjere kontrole bolničkih infekcija, i liječiti ih empirijskom antimikrobnom terapijom šireg spektra do dobivanja rezultata mikrobioloških pretraga.
- Karbapenemi se i dalje smatraju najboljim izborom u liječenju infekcija uzrokovanih MDR enterobakterijama koje luče ABL, ali njihovu uporabu bi bilo poželjno poštediti, i time ograničiti selekcijski pritisak koji vodi do pojave otpornosti na karbapeneme u gram-negativnih bakterija. Iako su se u ovoj studiji neki alternativni izbori pokazali učinkovitim u *in vitro* testiranjima, poput temocilina ili fosfomicina, još uvijek nema dovoljno studija koje pružaju čvrste dokaze o sigurnom izboru alternativnog lijeka u empirijskoj ili konačnoj terapiji MDR enterobakterija koje luče ABL.

## 7. SAŽETAK

Ovo istraživanje je provedeno kako bi se razjasnila genetska povezanost i molekularni mehanizmi rezistencije višestruko otpornih izolata vrste *Proteus mirabilis* koji luče AmpC  $\beta$ -laktamazu, prikupljenih u Kliničkom bolničkom centru Split, te kako bi definirali učinkovite antimikrobne lijekove *in vitro*.

Prikupljeno je ukupno 100 neponavljajućih, uzastopnih izolata *P. mirabilis* otpornih na amoksisilin/klavulanat i cefoksitin, uglavnom iz urina (44%) i uzoraka infekcija kože i mekog tkiva (30%). Svi izolati su bili pozitivni u cefoksitin Hodge testu, i negativni u testu lučenja  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra. Gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju identificirana su četiri klastera i dva pojedinačna makrorestriksijska profila, sa 79% izolata u dominantnom klasteru. Molekularna karakterizacija i *I*-Ceul analiza reprezentativnih predstavnika izolata otkrila je smještaj *bla*<sub>CMY-16</sub> gena na kromosomu, i insercijski element *ISEcp1* postavljen 110 pb uzvodno od početnog kodona *bla*<sub>CMY-16</sub>. Također, u svih je detektiran *bla*<sub>TEM-1</sub>, osim jednog s *bla*<sub>TEM-2</sub>.

Svi su bili rezistentni na trimetoprim-sulfametoksazol, svi osim jednog na kinolone, a 81% na sve aminoglikozide, dok je 77% bilo osjetljivo (S), a 22% intermedijarno (I) na piperacilin/tazobaktam, a 4% je bilo S i 68% I na cefepim. Samo 15% je bilo S na ceftolozan/tazobaktam. Meropenem, ertapenem, ceftazidim/avibaktam, temocilin i fosfomicin pokazali su 100%-tnu učinkovitost *in vitro*.

Ovo je prvo izvješće o *bla*<sub>CMY-16</sub> genu u vrsti *P. mirabilis* iz bolničkih uzoraka u Hrvatskoj. Nalazi su u skladu s talijanskim i grčkim izvješćima. Klonska priroda izolata ukazuje na visok potencijal klonskog širenja. Trebalo bi razmotriti alternativne antimikrobne lijekove kako bi se poštedjela uporaba karbapenema.

Nadalje, ovo istraživanje je provedeno i radi utvrđivanja čimbenika rizika povezanih s obolijevanjem od sepse uzrokovane MDR izolatima *P. mirabilis* koji luče ABL, kao i utvrđivanja povezanosti takve sepse s većom vjerojatnosti neprimjerenog empirijskog antimikrobnog liječenja.

Osmišljeno je istraživanje slučajeva i kontrola. Ispitivanu populaciju činilo je 147 odraslih bolničkih pacijenata sa sepsom koju uzrokuje *P. mirabilis*, koji su pronađeni laboratorijskim informacijskim sustavom u razdoblju od 5 godina (2019. do 2023.). Čak 49,7% takvih sepsa uzrokovao je MDR *P. mirabilis*. Stjecanje MDR soja bilo je neovisno

povezano s bolničkom infekcijom (omjer izgleda [OR], 2,64; 95%-tni interval pouzdanosti [CI], 1,17 - 5,98), antimikrobnom terapijom tijekom 48 h ili duže u prethodna 3 mjeseca (OR 3,61 ; 95% CI, 1,67 - 7,78), i hospitalizacijom 48 h ili duže u prethodnih 12 mjeseci (OR, 6,2; 95% CI, 2,82 - 13,62). Bolesnici kojima sepsu uzrokuje MDR *P. mirabilis* vjerojatnije će dobiti neprimjerenu empirijsku antimikrobnu terapiju nego oni kojima je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis*. Iako uz mogućnost velike pogreške i široki interval pouzdanosti, ipak se izračunala vjerojatnost neprimjerene empirijske terapije od 0.36 za skupinu kojoj je uzročnik sepse MDR *P. mirabilis*, i 0.007 za skupinu s kojoj je uzročnik osjetljivi *P. mirabilis*.

U skupini pacijenata sa sepsom koju uzrokuje MDR *P. mirabilis*, uspjeh mikrobiološke eradikacije u 72 h od početka sepse je bio 5 puta veći za one pacijente koji su u prvih 24 h empirijski liječeni karbapenemima (OR, 4,96; 95% CI, 1,22 – 20,21).

Rezultati ovog istraživanja bi trebali podići svijest kliničara o MDR izolatima *P. mirabilis* kao mogućim uzročnicima sepse u određenim rizičnim skupinama, što bi trebalo biti praćeno brzom provedbom odgovarajućih mjera kontrole infekcije, i primjenom prikladne empirijske antimikrobne terapije sa širim spektrom djelovanja.



## 8. SUMMARY

This study was performed to elucidate genetic relatedness and molecular resistance mechanisms of AmpC-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates in University Hospital of Split (UHS), and define efficient antibiotics *in vitro*.

A total of 100 nonrepeated, consecutive, amoxicillin/clavulanate- and ceftoxitin-resistant *P. mirabilis* isolates were collected, mostly from urine (44%) and skin and soft-tissue samples (30%). They were all positive in ceftoxitin Hodge test and negative for extended spectrum  $\beta$ -lactamase production. Pulsed field gel electrophoresis identified four clusters and two singletons, with 79% of isolates in dominant cluster. Molecular characterization and *I*-Ceul analysis of representatives revealed *bla*<sub>CMY-16</sub> gene located on chromosome, and insertion element *ISEcp1* positioned 110 pb upstream of *bla*<sub>CMY-16</sub> starting codon. They also harbored *bla*<sub>TEM-1</sub>, except one with *bla*<sub>TEM-2</sub>.

They were all resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole, all but one to quinolones, and 81% to all aminoglycosides, while 77% were susceptible (S) and 22% intermediate (I) to piperacillin/tazobactam, and 4% were S and 68% I to cefepime. Only 15% were S to ceftolozane/tazobactam. Meropenem, ertapenem, ceftazidime/avibactam, temocillin, and fosfomycin were 100% efficient *in vitro*. This is the first report of *bla*<sub>CMY-16</sub> gene in *P. mirabilis* from hospital samples in Croatia.

The findings are in accordance with Italian and Greek reports. The clonal nature of outbreak suggests the high potential of clonal spread. Alternative agents should be considered to spare carbapenem usage.

Furthermore, this study was performed to determine the risk factors associated with sepsis caused by MDR *P. mirabilis* isolates that produce ABL, as well as to determine the association of such sepsis with a higher probability of inappropriate empiric antimicrobial treatment.

A case-control study was designed. The examined population consisted of 147 adult inpatients with sepsis caused by *P. mirabilis* identified by laboratory information system over a 5-year period (2019 to 2023). As many as 49.7% of such sepsis were caused by MDR *P. mirabilis*. Acquisition of an MDR strain was independently associated with hospital-acquired infection (odds ratio [OR], 2.64; 95% confidence interval [CI], 1.17 - 5.98), antimicrobial therapy for 48 h or more in the previous 3 months (OR 3.61; 95% CI, 1.67 - 7.78), and

hospitalization for 48 h or more in the previous 12 months (OR, 6.2; 95% CI, 2.82 - 13.62). Patients with sepsis caused by MDR *P. mirabilis* will more likely receive inadequate initial antimicrobial therapy than those with non-MDR infections. Although with the possibility of a large error and a wide confidence interval, the probability of inappropriate empiric therapy was calculated as 0.36 for the group with MDR *P. mirabilis* as a cause of sepsis, and 0.007 for the group with sensitive *P. mirabilis*.

In the group of patients with sepsis caused by MDR *P. mirabilis*, the success of microbiological eradication within 72 h from the onset of sepsis was 5 times higher for those patients who were empirically treated with carbapenems in the first 24 h (OR, 4.96; 95% CI, 1.22 – 20.21).

These findings can raise clinician's awareness of MDR *P. mirabilis* as a possible causative agent of sepsis in certain risk groups, which can then be followed by prompt implementation of appropriate infection control measures and administration of more appropriate broad-spectrum empirical antimicrobial therapy.

## 9. POPIS LITERATURE

1. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):534-46.
2. Girlich D, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Genetics of acquired antibiotic resistance genes in *Proteus* spp. *Front Microbiol.* 2020;11:256.
3. Hauser G. Über fäulnisbakterien und deren beziehungen zur septicämie. Ein betrag zur morphologie der spaltpilze. Leipzig, Germany: Vogel; 1885.
4. Hoeniger JFM. Development of Flagella by *Proteus mirabilis*. *J Gen Microbiol.* 1965;40:29–42.
5. Prywer J, Olszynski M. Bacterially induced formation of infectious urinary stones: recent developments and future challenges. *Curr Med Chem.* 2017;24:292–311.
6. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus.* 2018;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969–76.
8. De Champs C, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:537–9.
9. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161-82.
10. Tonkic M, Mohar B, Sisko-Kraljevic K, Mesko-Meglic K, Goic-Barisic I, Novak A, i sur. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains in southern Croatia. *J Med Microbiol.* 2010;59:1185-90.
11. Sardelic S, Bedenic B, Sijak D, Colinon C, Kalenic S. Emergence of *Proteus mirabilis* isolates producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases in Croatia. *Chemotherapy.* 2010;56:208-13.
12. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, i sur. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4264–9.

13. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:573–81.
14. Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:1144–7.
15. Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Integration of the *bla*<sub>NDM-1</sub> carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:98–102.
16. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure based classification of class A  $\beta$ -lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:29–57.
17. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, i sur. Characterization of beta-lactamase gene *bla*<sub>PER-2</sub>, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:616–20.
18. Villar, H. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:365–70.
19. Tsai YL, Wang MC, Hsueh PR, Liu MC, Hu RM, Wu YJ, i sur. Overexpression of an outer membrane protein associated with decreased susceptibility to carbapenems in *Proteus mirabilis*. 2015; *PLoS One* 10:e0120395.
20. Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3080–3.
21. Di Pilato V, Chiarelli A, Boinett CJ, Riccobono E, Harris SR, D'Andrea MM, i sur. Complete genome sequence of the first KPC-type carbapenemase-positive *Proteus mirabilis* strain from a bloodstream infection. *Genome Announc.* 2016;23:4(3):e00607-16.
22. Beltrão EMB, Oliveira ÉM, Scavuzzi AML, Firmo EF, Lopes ACS. Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> and first report *bla*<sub>OXA-10</sub> in Brazil. *J Infect Chemother.* 2022;28(3):363-72.

23. Papagiannitsis CC, Miriagou V, Kotsakis SD, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Petinaki E, i sur. Characterization of a transmissible plasmid encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4024–5.
24. Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:136–9.
25. Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, Ivanova D, Lesseva M, Stoeva T, i sur. Dissemination of a multidrug-resistant VIM-1- and CMY-99-producing *Proteus mirabilis* clone in Bulgaria. *Microb Drug Resist*. 2017;23:345–50.
26. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, i sur. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:345–9.
27. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, i sur. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla<sub>NDM-1</sub>*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:5046–54.
28. Chen L, Laham NA, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Bonomo RA, i sur. First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:4305–7.
29. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, i sur. The spread of *bla<sub>OXA-48</sub>* and *bla<sub>OXA-244</sub>* carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:46.
30. Österblad M, Karah N, Halkilahti J, Sarkkinen H, Uhlin BE, Jalava J. Rare detection of the *Acinetobacter* class D carbapenemase *bla<sub>OXA-23</sub>* gene in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:3243–5.
31. Potron A, Hocquet D, Triponney P, Plésiat P, Bertrand X, Valot B. Carbapenem-susceptible OXA-23-producing *Proteus mirabilis* in the French community. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e00191-19.
32. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146:837.

33. Eriksson-Grennberg KG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. II. An improved mapping of the *ampA* gene. Genet Res. 1968;12:147-56.
34. 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;78:4897-901.
35. Knott-Hunziker V, Petursson Jayatilake GS, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. Active sites of  $\beta$ -lactamases. Biochem J 1982;201:621-7.
36. Doi Y, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, O'Keefe A, Endimiani A, i sur. Reduced susceptibility to cefepime among *Escherichia coli* clinical isolates producing novel variants of CMY-2 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(7):3159-61.
37. Rodríguez-Martínez JM, Fernández-Echauri P, Fernández-Cuenca F, Diaz de Alba P, Briales A, Pascual A. Genetic characterization of an extended-spectrum AmpC cephalosporinase with hydrolysing activity against fourth-generation cephalosporins in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* selected in vivo. J Antimicrob Chemother. 2012;67(1):64-8.
38. van Boxtel R, Wattel AA, Arenas J, Goessens WH, Tommassen J. Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded-AmpC-Expressing *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2016;61(1):e01413-16.
39. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrda*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2016;71:1188–98.
40. Wong D, van Duin D. Novel Beta-Lactamase Inhibitors: Unlocking Their Potential in Therapy. Drugs. 2017;77(6):615-628.
41. Balakrishnan I, Awad-El-Kariem M, Aali A, Kumari P, Mulla R, Tan B, i sur. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended spectrum and/or derepressed AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2011;66:2628– 31.
42. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ; Antibacterial Resistance Leadership Group. A primer on AmpC  $\beta$ -lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. Clin Infect Dis. 2019;69(8):1446-55.



43. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know. *Infection* 2019;47:363–75.
44. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:882-9.
45. Philippon A, Arlet G, Labia R, Iorga BI. Class C  $\beta$ -Lactamases: Molecular Characteristics. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(3):e0015021.
46. Nakano R, Okamoto R, Nagano N, Inoue M. Resistance to gram-negative organisms due to high-level expression of plasmid-encoded ampC beta-lactamase *bla*<sub>CMY-4</sub> promoted by insertion sequence *ISEcp1*. *J Infect Chemother.* 2007;13:18–23.
47. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:447-50.
48. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In vitro analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1282-6.
49. Hossain A, Mark Reisbig MD, Hanson ND. Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:964–70.
50. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. *ISCR* elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70:296-316.
51. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Villa L, Lebessi E, Vatopoulos AC, Carattoli A, i sur. CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3172-4.
52. Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, Bryce E, McGeer A, Ofner-Agostini M, i sur. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;270(2);265-71.
53. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol* 2007;2:297–307.
54. Kawai A, McElheny CL, Iovleva A, Kline EG, Sluis-Cremer N, Shields RK, i sur. Structural basis of reduced susceptibility to ceftazidime-avibactam and cefiderocol in

- Enterobacter cloacae* due to AmpC R2 loop deletion. Antimicrob Agents Chemother 2020;64:e00198-20.
55. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0, 2017. [https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms) (pristupljeno 20. siječnja 2024.)
  56. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [published correction appears in Lancet. 2022;400:1102]. Lancet. 2022;399:629-55.
  57. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Rev. 2015;28:565-91.
  58. Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. Clin Infect Dis. 2007;44:418-23.
  59. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, i sur. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233-9.
  60. Siedner MJ, Galar A, Guzmán-Suarez BB, Kubiak DW, Baghdady N, Ferraro MJ, i sur. Cefepime vs other antibacterial agents for the treatment of *Enterobacter* species bacteremia. Clin Infect Dis. 2014;58:1554–63.
  61. Lee NY, Lee CC, Li CW, Li MC, Chen PL, Chang CM, i sur. Cefepime therapy for monomicrobial *Enterobacter cloacae* bacteremia: unfavorable outcomes in patients infected by cefepime-susceptible dose-dependent isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:7558–63.
  62. Blanchette LM, Kuti JL, Nicolau DP, Nailor MD. Clinical comparison of ertapenem and cefepime for treatment of infections caused by AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Scand J Infect Dis. 2014;46:803–8.
  63. Hawkey PM, Warren RE, Livermore DM, McNulty CAM, Enoch DA, Otter JA, i sur. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. J Antimicrob Chemother. 2018;73(suppl\_3):iii2–iii78.

64. Harris PNA, Wei JY, Shen AW, Abdile AA, Paynter S, Huxley RR, i sur. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bloodstream infections caused by *Enterobacter*, *Citrobacter* or *Serratia* species: a systematic review with meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):296–306.
65. McKamey L, Venugopalan V, Cherabuddi K, Borgert S, Voils S, Shah K, i sur. Assessing antimicrobial stewardship initiatives: Clinical evaluation of cefepime or piperacillin/tazobactam in patients with bloodstream infections secondary to AmpC-producing organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52(5):719-23.
66. Maillard A, Delory T, Bernier J, Villa A, Chaibi K, Escaut L, i sur. Effectiveness of third-generation cephalosporins or piperacillin compared with cefepime or carbapenems for severe infections caused by wild-type AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: A multi-centre retrospective propensity-weighted study. *Int J Antimicrob Agents.* 2023;62(1):106809.
67. Lu B, Wong M, Ha D, Bounthavong M, Banaei N, Deresinski S, i sur. Piperacillin/tazobactam versus cefepime or carbapenems for ceftazidime-non-susceptible *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* and *Morganella morganii* bacteraemia in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother.* 2023;78(4):1009–14.
68. Burillo A, Bouza E. Controversies over the management of infections caused by AmpC- and ESBL-producing Enterobacterales : what questions remain for future studies? *Curr Opin Infect Dis.* 2022;35(6):575-82.
69. Stewart AG, Paterson DL, Young B, Lye DC, Davis JS, Schneider K, i sur. Meropenem versus piperacillin-tazobactam for definitive treatment of bloodstream infections caused by AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, or *Serratia marcescens*: a pilot multicenter randomized controlled trial (MERINO-2). *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(8):ofab387.
70. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Lucas K, , Witucki P, Rebold N, Holger DJ, i sur. High-dose Cefepime vs Carbapenems for Bacteremia Caused by Enterobacterales With Moderate to High Risk of Clinically Significant AmpC  $\beta$ -lactamase Production. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(3):ofad034.

71. Kang CI, Pai H, Kim SH, Kim HB, Kim EC, Oh MD, i sur. Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(6):1130-3.
72. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. Dostupno na [http://www.eucast.orghttps://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_13.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.orghttps://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf) (pristupljeno 20. siječnja 2024.)
73. Robin F, Auzou M, Bonnet R, Lebreuilly R, Isnard C, Cattoir V, i sur. *In vitro* activity of ceftolozane-tazobactam against *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates with different  $\beta$ -lactam resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9):e00675-18.
74. Stewart AG, Harris PNA, Chatfield MD, Littleford R, Paterson DL. Ceftolozane-tazobactam versus meropenem for definitive treatment of bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing Enterobacterales ("MERINO-3"): study protocol for a multicentre, open-label randomised non-inferiority trial. *Trials.* 2021;22(1):301.
75. Livermore DM, Meunier D, Hopkins KL, Doumith M, Hill R, Pike R, i sur. Activity of ceftazidime/avibactam against problem Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in the UK, 2015-16. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(3):648-57.
76. Xu M, Zhao J, Xu L, Yang Q, Xu H, Kong H, i sur. Emergence of transferable ceftazidime-avibactam resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* due to a novel CMY AmpC  $\beta$ -lactamase in China. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(1):136.e1-136.e6.
77. Zhou J, Wang W, Liang M, Yu Q, Cai S, Lei T, i sur. A novel CMY variant confers transferable high-level resistance to ceftazidime-avibactam in multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2023;11(2):e0334922.
78. Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:243-5.
79. Lupia T, De Benedetto I, Stroffolini G, Di Bella S, Pinna SM, Zerbato V, i sur. Temocillin: Applications in Antimicrobial Stewardship as a Potential Carbapenem-Sparing Antibiotic. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(4):493.

80. Grabein B, Graninger W, Rodríguez-Baño J, Dinh A, Liesenfeld DB. Intravenous fosfomycin—back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:363–72.
81. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):43-50.
82. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer  $\beta$ -lactamases in Gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3318–24.
83. Bret L, Chanal-Claris C, Sirot D, Chaibi EB, Labia R, Sirot J. Chromosomally encoded AmpC-type b-lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1110–4.
84. D’Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacca R, Vailati F, i sur. CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:618– 24.
85. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mroćwka A, Fiett J; Beta-PL Study Group. Molecular survey of  $\beta$ -lactamases conferring resistance to newer  $\beta$ -lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008,52:2449–54.
86. Luzzaro F, Brigante G, D’Andrea MM, Pini B, Giani T, Mantengoli E, i sur. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type  $\beta$ -lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33:328–33.
87. Mata C, Miro´ E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal *ampC* genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:472–6.
88. Miriagou V, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Casals JB, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Detecting VIM-1 production in *Proteus mirabilis* by an imipenem-dipicolinic acid double disk synergy test. *J Clin Microbiol.* 2010;48:667– 8.

89. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, i sur. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2735–42.
90. Literacka E, Empel J, Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including two novel enzymes, CMY-14 and -15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4136–43.
91. Schneider I, Markovska R, Marteva-Proevska Y, Mitov I, Markova B, Bauernfeind A. Detection of CMY-99, a novel acquired AmpC-Type  $\beta$ -lactamase, and VIM-1 in *Proteus mirabilis* isolates in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):620-1.
92. Verdet C, Gautier V, Chachaty E, Ronco E, Hidri N, Decré D, i sur. Genetic context of plasmid-carried *bla*CMY-2-like genes in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4002–06.
93. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*CTX-M beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2938–45.
94. Bidet P, Verdet C, Gautier V, Bingen E, Arlet G. First description of DHA-1 AmpC beta-lactamase in *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:591–2.
95. Yong D, Lim Y, Song W, Choi YS, Park DY, Lee H, i sur. Plasmid-mediated, inducible AmpC beta-lactamase (DHA-1)-producing Enterobacteriaceae at a Korean hospital: wide dissemination in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* and emergence in *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53:65–70.
96. Girlich D, Karim A, Spicq C, Nordmann P. Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:893–895.
97. Rhimi-Mahjoubi F, Bernier M, Arlet G, Jemaa ZB, Jouve P, Hammami A, i sur. Identification of plasmid-encoded cephalosporinase ACC-1 among various enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolated from a Tunisian hospital (Sfax 997-2000). *Pathol Biol.* 2002;50:7–11.
98. Strich JR, Heil EL, Masur H. Considerations for empiric antimicrobial therapy in sepsis and septic shock in an era of antimicrobial resistance. *J Infect Dis.* 2020;222(Suppl 2):S119-S131.

99. Marquet K, Liesenborgs A, Bergs J, Vleugels A, Claes N. Incidence and outcome of inappropriate in-hospital empiric antibiotics for severe infection: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2015;19(1):63.
100. Weinberger J, Rhee C, Klompas M. A critical analysis of the literature on time-to-antibiotics in suspected sepsis. *J Infect Dis*. 2020;222(Suppl 2):S110-S118.
101. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. Dostupno na [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/previous\\_versions\\_of\\_documents](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents) (pristupljeno 30. siječnja 2024.)
102. Lenth RV. Java Applets for Power and Sample Size [Computer software]. 2006-9. Dostupno na <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power> (pristupljeno 20. prosinca 2023.)
103. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):380-407.
104. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. Dostupno na [www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms) (pristupljeno 30 siječnja 2024.)
105. Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC beta-lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Methods*. 2009;34:38-43.
106. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y. Dissemination of the CTX-M-25 family beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:289-95.
107. Pèrez-Pèrez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2153-62.
108. Jelic M, Skrlin J, Bejuk D, Koscak I, Butic I, Guzvinec M, i sur. Characterization of isolates associated with emergence of OXA-48- producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *Microb Drug Resist*. 2018;24:973-79.
109. Sirichote P, Hasman H, Pulsrikarn C, Schønheyder HC, Samulionienė J, Pornruangmong S, i sur. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing

- Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. J Clin Microbiol. 2010;48:883–8.
110. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC). 2015. BSAC susceptibility testing. Version 14. Dostupno na <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-Susceptibility-testing-version-14.pdf> (pristupljeno 30. siječnja 2024.)
111. Firth D. Bias Reduction of Maximum Likelihood Estimates. Biometrika. 1993;80:27–38.
112. Decre D, Verdet C, Raskine L, Blanchard H, Burghoffer B, Philippon A, i sur. Characterization of CMY-type  $\beta$ -lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. J Antimicrob Chemother. 2002;50:681-8.
113. Conen A, Frei R, Adler H, Dangel M, Fux CA, Widmer AF, i sur. Microbiological screening is necessary to distinguish carriers of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae because of clinical similarity. 2015;PLOS One 24:e0120688.
114. Kohner PC, Robberts FJ, Cockerill FR 3rd, Patel R. Cephalosporin MIC distribution of extended-spectrum-beta-lactamase- and pAmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. J Clin Microbiol. 2009;47:2419– 25.
115. Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase on *in vitro* susceptibility of *Escherichia coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:494–8.
116. Wu TL, Siu LK, Su LH, Lauderdale TL, Lin FM, Leu HS, i sur. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1  $\beta$ -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2001;47:755–761.
117. Barthelemy M, Pe' duzzi J, Labia R. Distinction entre les structures primaires des beta-lactamases TEM-1 et TEM-2. Ann Inst Pasteur Microbiol. 1985;136:311– 21.
118. D'Andrea MM, Giani T, Henrici De Angelis L, Ciacci N, Gniadkowski M, Miriagou V, i sur. Draft genome sequence of *Proteus mirabilis* NO-051/03, representative of a multidrugresistant clone spreading in Europe and expressing the CMY-16 AmpC-type  $\beta$ -lactamase. Genome Announc. 2016;11: pii: e01702-15.



119. Cheng MP, Lee RS, Cheng AP, De L'Étoile-Morel S, Demir K, Yansouni CP, i sur. Beta-lactam/beta-lactamase inhibitor therapy for potential AmpC-producing organisms: a systematic review and meta-analysis. In Open forum infectious diseases 2019 Jul (Vol. 6, No. 7, p. ofz248). US: Oxford University Press.
120. da Cunha Ferreira T, Martins IS. Risk Factors of Death in Bloodstream Infections Caused by AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacterales in Patients with Neoplasia. Infect Drug Resist. 2021;14:3083-97.
121. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, i sur. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). Clin Microbiol Infect. 2022;28(4):521-47.
122. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Antimicrobial-Resistant Treatment Guidance: Gram-Negative Bacterial Infections. Infectious Diseases Society of America 2023; Version 3.0. Dostupno na <https://www.idsociety.org/practice-guideline/amr-guidance/>. (pristupljeno 15. svibnja 2024.)
123. Robin F, Auzou M, Bonnet R, Lebreuilly R, Isnard C, Cattoir V, i sur. *In Vitro* Activity of Ceftolozane-Tazobactam against *Enterobacter cloacae* Complex Clinical Isolates with Different beta-Lactam Resistance Phenotypes. Antimicrob Agents Chemother 2018;62(9):e00675-18.
124. Niu S, Wei J, Zou C, Chavda KD, Lv J, Zhang H, i sur. *In vitro* selection of aztreonam/avibactam resistance in dual-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2020;75(3):559-65.
125. Lee NY, Lee CC, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR, Ko WC. Cefepime therapy for monomicrobial bacteremia caused by cefepime-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: MIC matters. Clin Infect Dis. 2013; 56: 488-95.
126. Tamma PD, Girdwood SC, Gopaul R, Tekle T, Roberts AA, Harris AD, i sur. The use of cefepime for treating AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. Clin Infect Dis. 2013;57(6):781-8.

127. Wang R, Cosgrove SE, Tschudin-Sutter S, Han JH, Turnbull AE, Hsu AJ, i sur. Cefepime therapy for cefepime-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae bacteremia. In Open forum infectious diseases 2016 May 1 (Vol. 3, No. 3, p. ofw132). Oxford University Press.
128. Chopra T, Marchaim D, Veltman J, Johnson P, Zhao JJ, Tansek R, i sur. Impact of cefepime therapy on mortality among patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents Chemother. 2012;56(7):3936-42.
129. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. Int J Antimicrob Agents 2011;37:415–9.
130. Tsakris A, Koumaki V, Politi L, Balakrishnan I. Activity of temocillin against KPC-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 2020;55(1):105843.
131. Delory T, Gravier S, Le Pluart D, Gaube G, Simeon S, Davido B, i sur. Temocillin versus carbapenems for urinary tract infection due to ESBL-producing Enterobacteriaceae: a multicenter matched case-control study. Int J Antimicrob Agents. 2021;58(1):106361.
132. Ciesielczuk H, Doumith M, Hope R, Woodford N, Wareham DW. Characterization of the extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* ST131 clone among isolates recovered from urinary and bloodstream infections in the United Kingdom. J Med Microbiol. 2015;64(12):1496-503.
133. Barton E, Flanagan P, Hill S. Spinal infection caused by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* treated with temocillin. J Infect. 2008;57(4),347–9.
134. Saylam K, Anaf V, Kirkpatrick C. Successful medical management of multifocal psoas abscess following cesarean section: Report of a case and review of the literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2002;102(2):211-4.
135. Laterre PF, Wittebole X, Van de Velde S, Muller AE, Mouton JW, Carryn S, i sur. Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. J Antimicrob Chemother. 2015;70(3):891-8.
136. Habayeb H, Sajin B, Patel K, Grundy C, Al-Dujaili A, Van de Velde S. Amoxicillin plus temocillin as an alternative empiric therapy for the treatment of severe hospital-

- acquired pneumonia: results from a retrospective audit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1693-9.
137. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Guidance on the use of fosfomycin intravenously (5 December, 2023). Dostupno na: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Guidance\\_documents/Use\\_of\\_fosfomycin\\_iv\\_breakpoints\\_General\\_advice\\_20231127.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Use_of_fosfomycin_iv_breakpoints_General_advice_20231127.pdf) (pristupljeno 15. svibnja 2024.)
138. Dijkmans AC, Zacarías NVO, Burggraaf J, Mouton JW, Wilms EB, van Nieuwkoop C, i sur. Fosfomycin: Pharmacological, Clinical and Future Perspectives. *Antibiotics (Basel)*. 2017;6(4):24.
139. Antonello RM, Principe L, Maraolo AE, Viaggi V, Pol R, Fabbiani M, i sur. Fosfomycin as Partner Drug for Systemic Infection Management. A Systematic Review of Its Synergistic Properties from In Vitro and In Vivo Studies. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(8):500.
140. Berleur M, Guérin F, Massias L, Chau F, Poujade J, Cattoir V, i sur. Activity of fosfomycin alone or combined with temocillin *in vitro* and in a murine model of peritonitis due to KPC-3- or OXA-48-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3074-80.
141. Sojo-Dorado J, López-Hernández I, Rosso-Fernandez C, Morales IM, Palacios-Baena ZR, Hernández-Torres A, i sur.; REIPI-GEIRAS-FOREST group. Effectiveness of Fosfomycin for the Treatment of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Bacteremic Urinary Tract Infections: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2022 Jan 4;5(1):e2137277.
142. Granata G, Cicalini S. The Evolving Challenge of Appropriate Antibiotics Use in Hospitalized COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review. *Antibiotics*. 2024; 13(6):545.
143. Tumbarello M, Treccarichi EM, Fiori B, Losito AR, D'Inzeo T, Campana L, i sur. Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3224-31.
144. Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G, i sur. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2598–605.

145. Hilty M, Betsch BY, Bogli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Küffer M, i sur. Transmission dynamics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):967–975.
146. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A, Slegel F, i sur. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):934–44.
147. Paterson DL. “Collateral damage” from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(Suppl. 4):S341–5.
148. Tumbarello M, Trecarichi EM, Bassetti M, De Rosa FG, Spanu T, Di Meo E, i sur. Identifying patients harboring extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae on hospital admission: derivation and validation of a scoring system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3485-90.
149. Timbrook TT, Fowler MJ. Predicting Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae Bacteremia: A Diagnostic Model Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Sep 17;12(9):1452.
150. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC infect Dis*. 2017;17(1):279.
151. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, i sur. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181-247.

## 11. ŽIVOTOPIS

## **OSOBNI PODATCI:**

**Ime i prezime:** Žana Rubić

**Datum i mjesto rođenja:** 4. siječnja 1975., Metković

**Državljanstvo:** Republike Hrvatske

**Adresa:** Velebitska 16, 21000 Split

**Kontakt:** + 385 91 205 5999

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

## **PODATCI O ŠKOLOVANJU I ZAPOSLENJU:**

1989-1993 Zdravstvena škola u Splitu, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar

1993.-1999. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij u Splitu

1999.-2001. Liječnik pripravnik u Kliničkom bolničkom centru Split

2001.-2009. Liječnik opće medicine u ordinacijama obiteljske medicine u Splitu (Brodosplit, Trstenik i Mertojak), te u Hrvacama i Stobreču

2009.-2013. Specijalizacija medicinske mikrobiologije s parazitologijom

2011.-2012. Stručni poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Od 2013. do danas - Specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije, Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, KBC Split

2014.-2017. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij "TRIBE", Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Od 2013. - naslovni asistent na katedri Medicinska mikrobiologija i parazitologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu (medicina, dentalna medicina, farmacija i studij medicine na engleskom jeziku) i Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija (sestrinstvo i primaljstvo, fizioterapija, radiološka terapija i medicinsko-

laboratorijska dijagnostika)

#### **NASTAVNE AKTIVNOSTI:**

- predmet Medicinska mikrobiologija i parazitologija (studij medicine, dentalne medicine, farmacije, studij medicine na engleskom jeziku, zdravstveni studiji), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- predmet Klinička mikrobiologija i parazitologija (studij medicine i studij medicine na engleskom jeziku), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

#### **ČLANSTVA U ORGANIZACIJAMA I POVJERENSTVIMA:**

- Hrvatski liječnički zbor (HLZ)
- Hrvatska liječnička komora (HLK)
- Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju (HDKM)
- Hrvatska udruga bolničkih liječnika (HUBOL)
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)
- ESCMID Study Group for Antimicrobial Stewardship (ESGAP)
- Od 2015. članica Povjerenstva za kvalitetu KBC Split
- Od 2023. članica Tima za infekcije lokomotornog sustava KBC Split

#### **ZNANSTVENI INTERES:**

- Istraživanje mehanizama otpornosti bakterija na antimikrobne lijekove
- Upravljanje antimikrobnim liječenjem (engl. *antimicrobial stewardship*)
- Izrada smjernica za antimikrobno liječenje
- Liječenje infekcija kostiju i zglobova i infekcija povezanih s biofilmom

#### **STRANI JEZICI:**

- engleski jezik (napredno)
- talijanski jezik (osnovno)

#### **ZNANSTVENO I STRUČNO USAVRŠAVANJE:**

- ESCMID Postgraduate Education Course: Antimicrobial Stewardship: Measuring, Auditing and Improving, 29 – 31 March 2012, London, United Kingdom.
- ESCMID Postgraduate Education Course: Antimicrobial Stewardship Programmes: Developing, Implementing & Measuring, 8 - 10 May 2014, Seva (Barcelona), Spain
- The University of Dundee and British Society for Antimicrobial Chemotherapy Online Course: Antimicrobial Stewardship: Managing Antibiotic Resistance (<https://www.futurelearn.com/courses/antimicrobial-stewardship>)
- PRO-IMPLANT Foundation: „Workshop On Management Of Periprosthetic Joint Infection (PJI)”, 5-6 October 2023, Charité University Medicine Berlin, Germany

#### POPIS PUBLIKACIJA:

1. Boattini M, Bianco G, Llorente LI, Acero LA, Nunes D, Seruca M, Mendes VS, Almeida A, Bastos P, Rodríguez-Villodres Á, Gascón AG, Halperin AV, Cantón R, Escartín MNL, González-López JJ, Floch P, Massip C, Chainier D, Barraud O, Dortet L, ... Costa C. Enterobacterales carrying chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases in Europe (EuESCPM): Epidemiology and antimicrobial resistance burden from a cohort of 27 hospitals, 2020-2022. *Int J Antimicrob Agents*. 2024;63(5):107115. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107115. Epub 2024 Feb 16.
2. Novak A, Dzelalija M, Goic-Barisic I, Kovacic A, Pirija M, Maravic A, Radic M, Marinovic J, **Rubic Z**, Carev M, Tonkic M. Phenotypic and Molecular Characterization of a Hospital Outbreak Clonal Lineage of *Salmonella enterica* Subspecies enterica serovar Mikawasima Containing *bla*<sub>TEM-1B</sub> and *bla*<sub>SHV-2</sub> That Emerged on a Neonatal Ward, During the COVID-19 Pandemic. *Microb Drug Resist*. 2024;30(3):118–26.
3. **Rubic Z**, Jelic M, Soprek S, Tarabene M, Ujevic J, Goic-Barisic I, Novak A, Radic M, Tambic Andrasevic A, Tonkic M. Molecular characterization of colistin resistance genes in a high-risk ST101/KPC-2 clone of *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital of Split, Croatia. *Int Microbiol*. 2023 Jan 23:1-7. doi: 10.1007/s10123-023-00327-3.



4. Goic-Barisic I, Milas I, Barisic I, Luksic B, Novak A, **Rubić Z**, Peric I, Tonkic M. A rare presentation of genitourinary tuberculosis mimicking abdominal tumor. *Acta Clin Croat*. 2022 Mar;61(1):153-6.
5. Tandara L, Filipi P, Supe Domic D, Kresic B, Ivic I, Stojanovic Stipic S, **Rubić Z**, Tandara M. Laboratory medicine in pandemic of COVID-19. *Biochem Med (Zagreb)*. 2022 Jun 15;32(2):020501. doi: 10.11613/BM.2022.020501. Epub 2022 Apr 15.
6. Bosnjak Kuharic D, Markovic D, Brkovic T, Jeric Kegalj M, **Rubić Z**, Vuica Vukasovic A, Jeroncic A, Puljak L. Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Sep 17;9(9):CD012820. doi: 10.1002/14651858.CD012820.pub2.
7. Goic-Barisic I, Radic M, Novak A, **Rubić Z**, Boban N, Luksic B, Tonkic M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization and *Clostridium difficile* infection in a haematologic patient. *Acta Clin Croat*. 2020 Sep;59(3):523-8.
8. Goic-Barisic I, Kovacic A, Medic D, Jakovac S, Petrovic T, Tonkic M, Novak A, **Rubić Z**, Radic M, Milosavljević B, Hrenovic J. Endemicity of OXA-23 and OXA-72 in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from three neighbouring countries in Southeast Europe. *J Appl Genet*. 2021 May;62(2):353-9.
9. **Rubić Z**, Soprek S, Jelic M, Novak A, Goic-Barisic I, Radic M, Tambic-Andrasevic A, Tonkic M. Molecular Characterization of  $\beta$ -Lactam Resistance and Antimicrobial Susceptibility to Possible Therapeutic Options of AmpC-Producing Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* in a University Hospital of Split, Croatia. *Microb Drug Resist*. 2021 Feb;27(2):162-9.
10. Marinovic J, Novak A, **Rubić Z**, Goic-Barisic I, Radic M, Barišić M, Tonkic M. Comparison of the novel Uroquattro HB&L™ system and classical phenotypic method for rapid screening of multidrug-resistant organism colonization at the University Hospital Centre Split, Croatia. *Infektoloski Glasnik*. 2020;40(1):15–9.

11. Kovacic A, Seruga Music M, Dekic S, Tonkic M, Novak A, **Rubic Z**, Hrenovic J, Goic-Barisic I. Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. *Int Microbiol*. 2017 Dec;20(4):165-9.
12. Popovic V, Arar D, Popovic DR, Barisic I, Tonkic M, Peric I, Novak A, **Rubic Z**, Katalinic-Jankovic V, Makek MJ, Goic-Barisic I. *Mycobacterium shimoidei*-cavitary pulmonary disease with favorable outcome. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018 Mar;63(2):249-52.
13. Radic M, Goic-Barisic I, Novak A, **Rubic Z**, Tonkic M. Evaluation of PNA FISH® Yeast Traffic Light in identification of *Candida* species from blood and non-blood culture specimens. *Med Mycol*. 2016 Aug 1;54(6):654-8.
14. Versporten A, Bielicki J, Drapier N, Sharland M, Goossens H; ARPEC project group. The Worldwide Antibiotic Resistance and Prescribing in European Children (ARPEC) point prevalence survey: developing hospital-quality indicators of antibiotic prescribing for children. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):1106-17.
15. Radic M, Goic Barisic I, Kuscevic D, Novak A, Tonkic M, **Rubic Z**. *Geotrichum capitatum* respiratory tract infection in a patient with polytrauma. *Infez Med*. 2015 Sep;23(3):270-4.
16. Novak A, **Rubic Z**, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:31-6.
17. **Rubic Z**, Novak A, Tomic Z, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Prompt diagnosis and effective treatment of *Trichosporon asahii* catheter-related infection in non-immunocompromised neurosurgical patient. *Mycopathologia*. 2015 Feb;179(1-2):125-8.
18. Novak A, Goic-Barisic I, Andrasevic AT, Butic I, Radic M, Jelic M, **Rubic Z**, Tonkic M. Monoclonal outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in

intensive care unit, University Hospital Centre Split, Croatia. *Microb Drug Resist.* 2014 Oct;20(5):399-403.

19. Sardelic S, Karanovic J, **Rubic Z**, Polic B, Ledenko V, Markic J, Mestrovic J. Late ventriculoperitoneal shunt infection caused by *Shewanella algae*. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 May;29(5):475-7.
20. Mestrovic J, **Rubic Z**, Brekalo F.: Hospital Infections in Pediatric Intensive Care Unit. 6th Postgraduate Course of Continuing Medical Education (1th category) "Secondary Prevention in Pediatrics" 2011; collection of papers: 83-9.

#### **PREZENTACIJE POSTERA:**

1. Novak A, Gveric Grginic A, Goic-Barisic I, **Rubic Z**, Radic-Skelin M, Marinovic J, Smolic D, Kuzle J, Skara Abramovic L, Tabain I, Juric D, Ferencak I, Tonkic M. Whole genome sequencing of phenotypically detected quinolone and tetracycline co-resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and emergence of multidrug-resistant *C. coli* in the University Hospital of Split, Croatia / 34th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2024; Barcelona, Spain, poster, abstract
2. Novak A, Kovacic A, Pirija M, Goic-Barisic I, Marinovic J, **Rubic Z**, Radic Skelin M, Lozina M, Juric D, Carev M, Tonkic M. Hospital outbreak and persistence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing *Salmonella Mikawasima* in a neonatal ward, University Hospital of Split, Croatia. 33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2023, Copenhagen, Denmark, poster, abstract
3. Tijardovic B, Novak A, Goic-Barisic I, **Rubic Z**, Tonkic M. Aetiology of infective gastroenterocolitis in the University Hospital of Split in 2020. 32<sup>nd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2022, Lisbon, Portugal, poster, abstract
4. Acosta F, Sustic I, Tonkic M, Novak A, **Rubic Z**, Goic-Barisic I, Karanovic J. Surveillance of species distribution and antifungal susceptibility of nosocomial candidaemia

- during a five-year period in a university hospital centre from Croatia. 29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2017, Vienna, Austria, poster, abstract
5. **Rubic Z**, Marovic Z, Seruga Music M, Skoric D, Novak A, Tonkic M, Goic Barisic I, Hrenovic J. High level colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolate from patient with mediastinitis after coronary artery bypass graft and aortic valve replacement. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2017; Vienna, Austria, poster, abstract
  6. Giamarellos-Bourboulis E, Goic Barisic I, Kovacic A, Tonkic M, Seruga Music M, Novak A, **Rubic Z**, Hrenovic J. Hospital wastewater as a route for transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside the hospital setting. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2017; Vienna, Austria, poster, abstract
  7. Acosta F, Anita N, **Rubic Z**, Boban N, Luksic B, Radic M, Goic-Barisic I, Tonkic M. *Clostridium difficile* infection in a University Hospital Centre Split, HR: trends in microbiological diagnosis and antimicrobial susceptibility over five-year period (2010-2015). 26<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2016; Amsterdam, Netherlands, poster, abstract
  8. **Rubic Z**, Soprek S, Jelic M, Novak A, Goic-Barisic I, Radic, Tambic-Andrasavec A, Tonkic M.: In vitro antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* coproducing TEM and CMY-16 beta-lactamases. 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2015; Copenhagen, Denmark, poster, abstract
  9. Acosta F, Anita N, Jezina Buselic M, Goic-Barisic I, Tonkic M, **Rubic Z**, Radic M, Ognjenovic Mirosevic M, Prentic-Bakic S. Oral candidiasis and effectiveness of miconazole treatment in patients receiving radiation for head and neck cancer in University Hospital Centre Split, Croatia. 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID 2015; Copenhagen, Denmark, poster, abstract
  10. **Rubic Z**, Soprek S, Jelic M, Radic M, Novak A, Goic-Barisic I, Tonkic M, Tambic-Andrasavec A: The first detection of plasmid-mediated AmpC B-lactamase in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from University Hospital Centre Split,

*Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
ECCMID 2014; Barcelona, Spain, poster, abstract*

11. **Rubic Z, Radic M, Tonkic M, Novak A, Goic-Barisic I.** *Vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in the University Hospital Split: Implications for therapy / 10<sup>th</sup> Croatian Congress of Clinical Microbiology, 2013; Rovinj, Croatia, poster, abstract*

12. **Rubic Z, Novak A, Tomic Z, Tonkic M, Goic-Barisic I, Radic M:** *Case report: Trichosporon asahii catheter-related infection in a non-immunocompromised patient successfully treated with voriconazole / 10<sup>th</sup> Croatian Congress of Clinical Microbiology, 2013; Rovinj, Croatia, poster, abstract*

#### **POZVANO PREDAVANJE**

1. 12. HRVATSKI KONGRES KLINIČKE MIKROBIOLOGIJE I 9. HRVATSKI KONGRES O  
INFEKTIVNIM BOLESTIMA s međunarodnim sudjelovanjem CROCMID, 2019:

**Rubić Ž.** *Upravljanje uporabom antimikrobnih lijekova u KBC Split: dosadašnja iskustva /  
Antimicrobial stewardship in UHC Split: experience to date / 2019, Split, Croatia*

2. 32. SIMPOZIJ U ORGANIZACIJI PODRUŽNICE HDMBLM-A I KBC-A SPLIT,  
LABORATORIJSKA MEDICINA U PANDEMIJI COVID 19, 2021:

**Rubić Ž.** *Point-of-care testovi za otkrivanje SARS-CoV-2 infekcije*

3. ŠKOLA INFEKTOLOGIJE ST-2024:

**Rubić Ž:** *Mikrobioloska dijagnostika periprostetickih infekcija*

## 12. PRIVITAK

**Privitak 1. Obrazac za prikupljanje kliničkih podataka pacijenata**

Šifra pacijenta		Spol (M ili Z)
Datum rođenja		Godine
Odjel- klinika- zavod		

Datum prijema u bolnicu (dd/mm/yy)		Vanbolnička ili bolnička infekcija (VB ili B)	
Prijem iz:	Vlastitog doma	Staračkog doma	Druge zdravstvene ustanove
Dijagnoza:	Prijemna		Konačna
Izvor infekcije (IMS, IDS, IKT, OST, NEP)*			

Hospitalizacija ≥48h u prethodnih 12 mjeseci	DA ili NE	Datum i razlog hospitalizacije
Kirurški zahvat neposredno povezan s infekcijom	DA ili NE	Datum i vrsta zahvata
Antimikrobna terapija ≥48h u prethodna 3 mjeseca	DA ili NE	Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)
Invazivni zahvati u posljednjih 30 dana	DA ILI NE	Vrsta zahvata (UK, MV, CVK, OS)

COVID-19 pri prijemu ili u prethodna 3 mjeseca	DA ili NE	Datum, težina
--	-----------	---------------

Dijabetes	DA ili NE	Tip dijabetesa
-----------	-----------	----------------

Onkološka bolest	DA ili NE	Onkološka dijagnoza
------------------	-----------	---------------------

Kortikosteroidna terapija pri prijemu ili u prethodna 3 mjeseca	DA ili NE
---	-----------

Druga imunokompromitirajuća stanja	DA ili NE
	Dijagnoza stanja

Teška trauma	DA ili NE
	Dijagnoza traume



DATUM NASTANKA PRVE EPIZODE SEPSE		
PRIMJERENA EMPIRIJSKA TERAPIJA ≤24 h OD POJAVE SIMPTOMA SEPSE	DA	NE
Vrijeme uvođenja empirijske terapije	Početak terapije (dana, sati od prijema)	Trajanje terapije (dana, sati)
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		
PRIMJERENA KONAČNA TERAPIJA	DA	NE
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		
Vrsta antibiotika (P, PI, C12, C3, C4, Q, K, AG, OS)		

Ishodi:	Mikrobiološka eradikacija unutar 72 h	DA ili NE
	Kliničko poboljšanje unutar 72 h	DA ili NE
	Smrt unutar 60 dana od početka sepse	DA ili NE (dan smrti)

Duljina hospitalizacije nakon pojave sepse	kratak boravak: 0–5 dana (KR) srednje dug boravak: 6–10 dana (SD) dug boravak: > od 10 dana (DU)
--	--

KRATICE: M - muško; Z - žensko, VB – vanbolnička, B - bolnička, IMS - infekcije mokraćnog sustava, IDS - infekcije dišnog sustava, IKT – infekcije krvi i krvotvornog sustava, OST – infekcije koštano-mišićnog sustava, NEP – nepoznat izvor infekcije, P – penicilin i njegovi derivati, PI – beta-laktam uz dodatak inhibitora beta-laktamaze, C12 – cefalosporini 1. i 2. generacije, C3 – cefalosporini 3. generacije, C4 – cefalosporini 4. generacije, Q – fluorokinoloni, K – karbapenemi, AG – aminoglikozidi, OS – ostali antibiotici, KR – kratak boravak u bolnici, SD – srednje dug boravak u bolnici, DU – dug boravak u bolnici