

Rezistencija gram-negativnih bakterija na antibiotike

Jukopila, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:129543>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Vedran Jukopila

REZISTENCIJA GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Vedran Jukopila

REZISTENCIJA GRAM NEGATIVNIH BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Marina Bubonja Šonje, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Darinka Vučković, dr. med.
2. Izv. prof. dr. sc. Tanja Grubić Kezele, dr. med.
3. Doc. dr. sc. Bojana Mohar Vitezić, mag. mikrobiol.

Rad sadrži 39 stranica, 3 slike i 21 literaturni navod.

Zahvala

Za uspješan završetak Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci prvenstveno zahvaljujem obitelji koja me vjerno pratila kroz fakultetske dane te ih ispunila bezuvjetnom podrškom i razumijevanjem. Isto tako, zahvaljujem prijateljima i kolegama na svim danima ispunjenim druženjem, zabavom, smijehom i motivacijom. Usprkos napornom radu, trudu i vremenu uloženom u studij, fakultetskih dana sjećati ću se s osmijehom na licu znajući da su me oblikovali u osobu i liječnika kakav sam danas.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	3
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU	4
3.1 ANTIBIOTICI I ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA	4
3.1.1. Najvažnije skupine antibiotika	5
3.1.2. Čimbenici koji pridonose rezistenciji na antibiotike	6
3.1.3. Mehanizmi antimikrobne rezistencije	6
3.2 GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE I OBRASCI NJIHOVE OTPORNOSTI	8
3.2.1 Najvažniji gram-negativni patogeni i infekcije koje uzrokuju	9
3.2.1.1. <i>Enterobacterales</i>	9
3.2.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
3.2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
3.2.1.4. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	11
3.2.1.5. <i>Haemophilus influenza</i>	12
3.2.2. Najznačajniji mehanizmi rezistencije gram negativnih bakterija.....	13
3.3. DIJAGNOSTIČKE METODE ZA OTKRIVANJE REZISTENCIJE	17
3.4. STRATEGIJE ANTIBIOTSKOG LIJEČENJA GRAM-NEGATIVNIH INFEKCIJA .	20
3.4.1. Konvencionalni pristup liječenju i kombinirana terapija	20

3.4.2. Novi pristupi liječenju	22
3.5. STRATEGIJE ZA BORBU PROTIV REZISTENCIJE	26
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČCI.....	28
6. SAŽETAK.....	29
7. SUMMARY	30
8. LITERATURA.....	31
9. ŽIVOTOPIS	34

Popis skraćenica i akronima

AAC - aminoglikozid acetiltransferaza (engl. *aminoglycoside acetyltransferase*)

AAD - aminoglikozid adenilil transferaza (engl. *aminoglycoside adenylyl transferase*)

AME - enzim koji modificira aminoglikozid (engl. *aminoglycoside modifying enzyme*)

AMR - antimikrobna rezistencija (engl. *antimicrobial resistance*)

APH - aminoglikozid fosforil transferaza (engl. *Aminoglycoside phosphoryl transferase*)

BLI – inhibitor betalaktamaze (engl. *β -lactamase inhibitor*)

CDC - Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*)

DCAP - 2-((3-(3,6-dikloro-9H-karbazol-9-il)-2-hidroksipropil)amino)-2-(hidroksi-metil)

ESBL - betalaktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum beta-lactamase*)

EU - Europska unija

HUS - hemolitičko-uremički sindrom (engl. *Hemolytic uremic syndrome*)

KPC - karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae* (engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)

LF - lateral flow

LPS - lipopolisaharid

MALDI-TOF MS - matrično potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija masena spektrometrija (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)

MATE - multidrug and toxic compound extrusion

MBL - metalobetalaktamaza (engl. *Metallo- β -lactamases*)

MDR - otporan na više lijekova (engl. *multi-drug resistant*)

MFS - major facilitator superfamily

NGS - sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing*)

PBP - protein koji veže penicilin (engl. *penicillin-binding protein*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PDF - peptidna deformilaza (engl. *peptide deformylase*)

pEtN - fosfoetanolamin (engl. *Phosphoethanolamine*)

QRDR - quinolone resistance determining region

RND - resistance nodulation division

SERS - površinski poboljšano Ramanovo raspršenje (engl. *surface enhanced Raman scattering*)

SME - *Serratia marcescens* enzyme

SMR - small multidrug resistance

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organization*)

1. UVOD

Antimikrobna rezistencija (AMR) predstavlja značajnu prijetnju globalnom zdravlju i zahtijeva hitno međusektorsko djelovanje. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) rangirala je AMR kao jednu od deset najvećih globalnih prijetnji javnom zdravlju koje proizlaze iz zlouporabe i prekomjerne uporabe antimikrobnih lijekova, posebice antibiotika (1). Ovaj fenomen dovodi do razvoja patogena višestruke otpornosti na antibiotike što značajno ograničava našu sposobnost liječenja uobičajenih infekcija. Utjecaj antimikrobne rezistencije očituje se u olakšanom prijenosu bolesti, težim kliničkim slikama i povećanju smrtnih ishoda. Utjecaj rezistencije bakterija na antibiotike ugrožava zdravlje pojedinaca i zajednice te utječe na zdravstvene sustave kao cjelinu. Ekonomski troškovi liječenja infekcija uzrokovanih s rezistentnim bakterijama su značajni jer produljena bolest dovodi do duljeg boravka u bolnici, potrebe za skupljim lijekovima i povećanog financijskog opterećenja za bolesnike i zdravstveni sustav (1). Štoviše, bez učinkovitih antimikrobnih lijekova, uspjeh suvremene medicine, uključujući složene kirurške zahvate, transplantacije organa i kemoterapiju raka je ugrožen. AMR se javlja kao posljedica evolucijske prilagodbe bakterija pri čemu se stalno stvaraju novi mehanizmi rezistencije.

Gram-negativne bakterije predstavljaju poseban izazov u liječenju infekcija koje uzrokuju, zbog svoje sposobnosti da brzo razviju rezistenciju na više različitih skupina antibiotika i prenesu je novim jedinkama. Razvoj novih antimikrobnih lijekova od ključne je važnosti, posebno za borbu protiv infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama otpornim na karbapeneme, te pan-rezistentnim patogenima poznatim i kao "superbugs". Ove bakterije otporne na većinu ili na sve postojeće antimikrobne lijekove našle su se na listi „prioritetnih patogena“ SZO, bakterija za koje su hitno potrebni novi antibiotici (1).

Nekoliko čimbenika pridonosi pojavi i širenju AMR-a, uključujući zlouporabu i pretjeranu uporabu antimikrobnih lijekova; neadekvatne metode prevencije i kontrole infekcije; loše higijenske uvjete koji dovode do širenja patogena otpornih na antibiotike; ograničen pristup kvalitetnim lijekovima, cjepivima i dijagnostici; nedostatak svijesti i znanja (1). Bakterijske infekcije jedan su od vodećih uzroka bolesti i smrti, a otpornost na antibiotike je u porastu u svim dijelovima svijeta. Novi mehanizmi rezistencije stalno se pojavljuju i brzo šire po cijelom svijetu ograničavajući mogućnosti liječenja infekcija kao što su upale pluća, infekcije mokraćnog sustava, tuberkuloza, sepsa itd. (1). Rastuća otpornost Gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike predstavlja problem zdravstvenim sustavima diljem svijeta. Oportunističke infekcije uzrokovane nefermentativnim gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* predstavljaju veliku prijetnju hospitaliziranim i imunokompromitiranim bolesnicima. Hitnoća rješavanja problema rastuće otpornosti na antibiotike naglašena je ograničenim brojem novih antimikrobnih lijekova. Potrebno je ukazati na važnost odgovornog propisivanja antibiotika u primarnim zdravstvenim ustanovama i bolnicama te skrenuti pozornost na prevenciju širenja bolničkih infekcija.

2. SVRHA RADA

Svrha ovog rada je uz pomoć literature na zadanu temu istražiti otpornost Gram-negativnih bakterija na antibiotike i prikazati osnovne mehanizme otpornosti. Prikazat će se učinkovite metode za borbu protiv otpornosti bakterija na antibiotike i ukazati na globalne probleme koje rezistencija na antibiotike donosi.

3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU

3.1 Antibiotici i antimikrobna rezistencija

Antimikrobna rezistencija je proces koji se ne dešava naglo nego nastaje postupno kroz generacije bakterija te se prenosi sa stanice majke na stanice kćeri. S obzirom na način nastanka antimikrobnu rezistenciju dijelimo u dvije podskupine: AMR negenetskog podrijetla i AMR genetskog podrijetla. AMR negenetskog podrijetla podrazumijeva isključivo fenotipsku prilagodbu bakterije, npr. ako bakterije rastu u biofilmu ili se nalaze u apscesu u inficiranom tkivu otežan je pristup antibiotiku i bakterije su zaštićene od izlaganja antibiotiku.

Genetska rezistencija može biti **prirodna (intrinzična)** i **stečena**. Intrinzična rezistencija označava prirodenu otpornost bakterijske vrste na određeni antibiotik ili grupu antibiotika neovisno o mutaciji ili stjecanju dodatnog gena rezistencije. Određeni se antibiotici nikada ne mogu koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih intrinzično rezistentnom bakterijom. Primjer prirodene rezistencije je neosjetljivost mikoplazmi, bakterija koje nemaju staničnu stijenku, na sve antibiotike koji djeluju ometajući sintezu stanične stijenke. Nadalje, aminoglikozidi poput gentamicina nisu učinkoviti u liječenju infekcija uzrokovanih unutarstaničnim patogenima jer aminoglikozidi ne ulaze u stanicu (2). Budući da aminoglikozidi zahtijevaju aktivni transportni lanac elektrona za ulazak u bakterijsku stanicu i anaerobne su bakterije intrinzično otporne prema aminoglikozidima.

AMR genetskog porijekla ili stečena otpornost bakterija na antibiotike se postiže horizontalnim ili vertikalnim prijenosom genetskog materijala s mutirane bakterije na druge bakterije. Promjene genetskog materijala nastaju supstitucijom, delecijom ili adicijom baza na genskom lokusu. Prilikom sinteze proteina te promjene dovode do pomaka okvira čitanja ili zamjene aminokiselina

čime se funkcionalno mijenja sintetizirani protein. Spontane mutacije u bakterijskom kromosomu dešavaju se frekvencijom od oko 10^{10} . Kromosomski mutanti su najčešće rezistentni zahvaljujući promjeni strukturnog receptora za lijek (2). Međutim, bakterije kao genetički materijal ne koriste samo kromosome nego i posebne ekstrakromosomske genetičke elemente nazvane plazmidima. Plazmidi se također prenose diobom na stanice kćeri, ali se mogu prenositi i između dvije zrele bakterijske stanice. Plazmidni geni rezistencije često kontroliraju stvaranje enzima koji razgrađuju antimikrobne lijekove (2).

3.1.1. Najvažnije skupine antibiotika

Beta-laktamski antibiotici su jedni od najčešće korištenih antibiotika u kliničkoj praksi, a uključuju peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme. Oni inhibiraju sintezu bakterijske stanične stijenke vežući se na PBP, što dovodi do stanične smrti bakterija u diobi.

Cefalosporini treće i četvrte generacije, kao što su ceftazidim i cefepim, imaju širok spektar djelovanja protiv gram-negativnih bakterija. Oni inhibiraju sintezu bakterijske stanične stijenke vezanjem na proteine koji vežu penicilin (PBP). Cefalosporini se obično koriste za liječenje infekcija mokraćnog sustava, infekcija dišnog sustava i intraabdominalnih infekcija uzrokovanih pripadnicima obitelji *Enterobacteriaceae*. Neki od njih su djelotvorni i protiv pseudomonasa i acinetobaktera.

Karbapenemi, poput imipenema, meropenema i doripenema, antibiotici su širokog spektra koji se široko koriste u bolničkim ustanovama za empirijsko liječenje infekcija uzrokovanih rezistentnim

gram-negativnim bakterijama. Karbapenemi se često smatraju posljednjim antibioticima za liječenje teških infekcija uzrokovanih višestrukootpornim sojevima *P. aeruginosa* i *A. baumannii*.

Fluorokinoloni, kao što su ciprofloksacin i levofloksacin, pokazuju izvrsnu aktivnost protiv različitih gram-negativnih patogena. Oni imaju za cilj bakterijsku DNA girazu i topozomerazu IV, enzime uključene u replikaciju i popravak DNA. Fluorokinoloni se obično propisuju za infekcije mokraćnog sustava, infekcije dišnog sustava i intraabdominalne infekcije uzrokovane *E. coli*, *K. pneumoniae* i drugim gram-negativnim organizmima.

Aminoglikozidi, kao što su gentamicin i amikacin, imaju snažno baktericidno djelovanje protiv gram-negativnih bakterija. Oni ometaju bakterijsku sintezu proteina tako što se vežu za 30S ribosomsku podjedinicu. Aminoglikozidi se često koriste u kombinaciji s drugim antibioticima za liječenje ozbiljnih infekcija uzrokovanih enterobakterijama i pseudomonasom.

Polimiksini, osobito kolistin (polimiksin E), smatraju se antibioticima zadnjeg utočišta za gram-negativne infekcije uzrokovane rezistentnim patogenima. Kolistin ometa cjelovitost bakterijske stanične membrane što dovodi do stanične smrti. Kolistin je učinkovit protiv mikroorganizama poput *P. aeruginosa* i *A. baumannii*, ali je nefrotoksičan i neurotoksičan.

3.1.2. Čimbenici koji pridonose rezistenciji na antibiotike

Čimbenici koji najviše pridonose stvaranju AMR su: loša prevencija prijenosa infekcija, manjak dostupnosti dijagnostičkih metoda, pretjerano propisivanje antibiotika ili propisivanje neadekvatnih antimikrobnih lijekova, pretjerano korištenje antibiotika u agrikulturi, loše ekonomske prilike u državi, izostanak programa nadziranja upotrebe antibiotika te izostanak

programa za kontrolu infekcija. Kako bi se smanjila mogućnost prijenosa mikroorganizama potrebno je poštivati pravila aseptičnog rada kada je to neophodno, korištenje jednokratne zaštitne opreme prilikom boravka u blizini zaraženog pacijenta, pranje ruku i utrljavanje alkoholnih pripravaka prije i nakon pregleda pacijenata itd. Pojava rezistencije vrlo je dinamičan proces te se u praksi javlja nesrazmjer između brze pojave rezistencije i sporog dolaska novih antibiotika na tržište (u prosjeku traje oko 15-tak godina). Vodeća praksa empirijskog liječenja većine infekcija često doprinosi krivom odabiru antibiotika te pojavi i širenju antibiotske rezistencije. Jedan od uzroka je to što je konvencionalni pristup određivanja osjetljivosti na antibiotike dugotrajan budući da je temeljen na kultivaciji. Međutim, razvoj inovativnih dijagnostičkih metoda koje koriste amplifikaciju nukleinskih kiselina, hibridizaciju ili imunodijagnostičke tehnike ubrzavaju ovaj postupak skraćujući ga s nekoliko dana na nekoliko sati (3). Iako razmjerno skupe, ove nove metode imaju potencijal za širu primjenu i omogućavaju testiranje osjetljivosti na antibiotike izravno na mjestu skrbi (engl. point of care).

3.1.3 Mehanizmi antimikrobne rezistencije

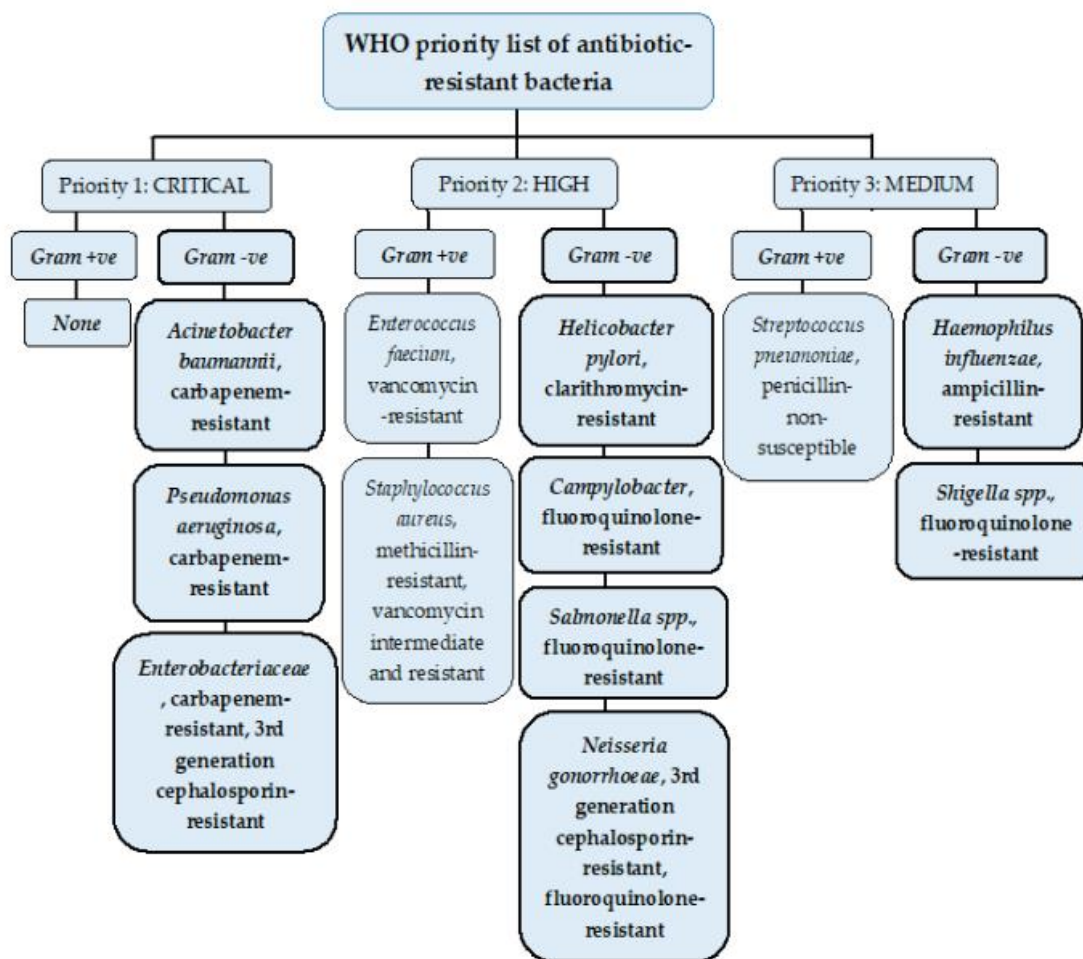
Četiri su glavna mehanizma AMR - **enzimatska razgradnja lijeka, promjena ciljnog mjesta, promjena propusnosti stanične membrane i pojačano izbacivanje antibiotika** iz bakterijske stanice. Kao primjer enzimatske razgradnje antibiotika mogu se uzeti gram-negativne bakterije koje su rezistentne na aminoglikozide. Aminoglikozidna rezistencija se prenosi plazmidima, a bakterije koje ga steknu proizvode enzime koji razgrađuju antibiotik i inaktiviraju ga. Promjena proteina na koji djeluje antibiotik podrazumijeva promjenu veznog mjesta antibiotika. Jedan od

primjera je neosjetljivost na eritromicin. Mikroorganizmi otporni na eritromicin imaju izmijenjeni eritromicinski receptor na 50S podjedinici ribosoma koji je rezultat metilacije 23S ribosomske RNA (2). Promjenom strukture enzima koji sudjeluje u nekom metaboličkom putu ili promjenom samog metaboličkog puta, bakterijski enzimi mogu postati otporni na djelovanje antibiotika. Bakterije mogu modificirati enzim koji je funkcionalno isti ali ima drugačiju strukturu čim inhibira ili u potpunosti smanjuje utjecaj određenih antibiotika. Tako promjenom strukture reduktaze dihidrofolne kiseline bakterije postaju rezistentne na trimetoprim. Naposljetku, promjenom propusnosti za antimikrobne lijekove, bakterije mogu ili smanjiti unos antibiotika u stanicu ili povećati njihovo odstranjivanje putem efluks pumpi. Promjenom permeabilnosti membrane, odnosno smanjenim unosom tetraciklina u stanicu, njegova se koncentracija u stanici smanjuje, a posljedično i njegov učinak na bakteriju. Mnogi gram-pozitivni i posebno gram-negativni organizmi razvili su potonji mehanizam rezistencije na tetracikline, makrolide, fluorokinolone i β -laktamske antibiotike.

3.2 Gram-negativne bakterije i obrasci njihove otpornosti

Zbog specifične građe stanične stijenke, a osobito zbog posjedovanja vanjske membrane gram-negativne bakterije su otpornije na antibiotike od gram-pozitivnih bakterija. Tako se na listi SZO „**prioritetnih bakterija**“ koje zbog višestruke rezistencije hitno zahtijevaju pronalazak novih antibiotike u skupini „**kritičnih**“ nalaze isključivo gram-negativne bakterije (Slika 1). Najvažniji gram-negativni uzročnici na listi su enterobakterije, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*

i *H. influenzae*. Infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim sojevima bakterija (MDR, engl. multidrug-resistant) povezane su sa značajnim stopama mortaliteta i smrtnosti.



Slika 1. Prioritetna lista SZO rezistentnih bakterija

(Izvor: Breijyeh Z i sur. 2016) (4)

3.2.1 Najvažniji gram-negativni patogeni i infekcije koje uzrokuju

Neki od najvažnijih Gram-negativnih uzročnika koji uzrokuju teške infekcije zbog rezistencije su pripadnici reda *Enterobacteriaceae* poput *E. coli* i *K. pneumoniae*, zatim *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* i *H. influenzae*. Sve veći problemi današnjice su MDR bakterije koje su otporne na više različitih skupina antibiotika te predstavljaju izniman izazov u liječenju.

3.2.1.1 *Enterobacterales*

Unutar reda *Enterobacterales* (bivša obitelj *Enterobacteriaceae*) nalaze se posebno zabrinjavajući oportunistički patogeni poput *E. coli*, *Klebsiella spp.* i *Enterobacter spp.* s obzirom na njihovu sposobnost brze kolonizacije, širenja i razvoja rezistencije. I SZO i CDC prepoznaju višestrukorezistentne pripadnike reda *Enterobacterales* kao izuzetno zabrinjavajuće patogene (5). Patogeni koji spadaju u red *Enterobacterales* vodeći su uzročnici infekcija mokraćnog sustava, infekcija krvotoka, bolničkih i izvan bolničkih pneumonija. Iako je njihova otpornost na beta-laktamske antibiotike uglavnom posredovana proizvodnjom beta-laktamaza proširenog spektra sve se češće pojavljuju i drugi mehanizmi otpornosti što dovodi do rezistencije na više skupina antibiotika i sve veće učestalosti MDR izolata bakterija (6, 7). Otpornost enterobakterija na beta-laktamsku klasu antibiotika posebno je zabrinjavajuća jer su beta-laktami kamen temeljac liječenja bakterijskih infekcija. Otpornost na beta-laktamske antibiotike može se biti posredovana efluksnim pumpama, promjenom veznih mjesta za antibiotik i beta-laktamazama koje cijepaju beta-laktamski

prsten i inaktiviraju ciljni antibiotik, pri čemu je produkcija beta-laktamaza osnovni način otpornosti na cefalosporine i karbapeneme.

Najčešće izolirana enterobakterija iz kliničkih uzoraka je *E. coli* koja je ujedno i vodeći uzročnik infekcija mokraćnog sustava. Enteropatogeni sojevi *E. coli* mogu inficirati gastrointestinalni sustav uzrokujući tzv. putničke proljeve, hemoragični kolitis ili hemolitičko uremički sindrom (HUS), ozbiljno stanje koje može dovesti do akutnog zatajenja bubrega, hemolitičke anemije i trombocitopenije. U novorođenčadi i imunokompromitiranih osoba *E. coli* može uzrokovati bakterijemiju i sepsu. Uz streptokoka grupe B, *E. coli* je najvažniji uzročnik meningitisa u novorođenačkoj dobi. Visoka rezistencija *E. coli* na ciprofloksacin, koja u nekim zemljama doseže i 93%, dovela je do toga da je ovaj antibiotik u potpunosti izbačen iz kliničkih smjernica za empirijsko liječenje infekcija mokraćnog sustava.

Najvažniji predstavnik roda *Klebsiella* je *K. pneumoniae*, nazvana tako zbog toga što je jedan od češćih uzročnika bolničkih pneumonija, osobito u bolesnika na respiratoru. Uzrokuje oko 10% bolničkih infekcija, a osim infekcija dišnog sustava čest je uzročnik infekcija mokraćnog sustava, infekcije rana i sepse, osobito u hospitaliziranih bolesnika (3, 7, 8).

Pripadnici roda *Enterobacter* također su među vodećim uzročnicima bolničkih infekcija koje mogu zahvatiti mnoge organske sustave uzrokujući pluća, mokraćni i krvožilni sustav i dr.

3.2.1.2. *Acinetobacter baumannii*

Bakterija *A. baumannii* je oportunistički patogen i čest uzročnik bolničkih infekcija - infekcija mokraćnog sustava, pneumonije, meningitisa, bakterijemije i sepse. *A. baumannii* može

kolonizirati gornje dijelove dišnog sustava, osobito u bolesnika na umjetnoj ventilaciji ne uzrokujući pri tom nikakve simptome. Zbog izrazito visoke stope rezistencije na antibiotike na prioritetoj je listi rezistentnih bakterija SZO i smještena je među „kritične“ uzročnike. Specifični rizični čimbenici za razvoj infekcije s *A. baumannii* uključuju: produljeni boravak u bolnici, oslabljeni imunitet, starija životna dob, prisutnost komorbiditeta, velike traume ili opekline, prethodna uporaba antibiotika, invazivni postupci i prisutnost *indwelling* katetera ili mehaničke ventilacije (9).

3.2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je aerobna, gram-negativna, okolišna bakterija koja nastanjuje tlo, vodu i vegetaciju te se može izolirati s kože i iz stolice zdravih osoba. Oportunistički je patogen koji je među vodećim uzročnicima bolničkih infekcija mokraćnog, krvožilnog i dišnog sustava te infekcija rana i sepse. Zbog specifične građe stanične stijenke intrinzično je rezistentan na većinu antibiotika i također ga je SZO ubrojila među kritične višestruko rezistentne bakterije na svojoj prioritetoj listi (Slika 1). Vrlo često inficira bolesnike smještene u jedinicama intenzivne njege (JIL), osobito kritično ugrožene. Statistički, *P. aeruginosa* je četvrti najčešće izolirani nozokomijalni patogen, drugi najčešći uzročnik pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom i treći najčešći gram-negativni uzročnik infekcija krvožilnog sustava. Kao oportunistička bakterija prisutna u okolišu često inficira rane i opekline, a njegovu prisutnost često karakterizira pojava plavo-zelenog gnojnog iscjetka. Pacijenti koji boluju od cistične fibroze bivaju kolonizirani rezistentnim sojevima *P. aeruginosa* koji uzrokuje kronične pneumonije s visokom stopom morbiditeta i mortaliteta. Jedan od vodećih

problema u bolničkim ustanovama je sve veća prevalencija sojeva *P. aeruginosa* koji proizvode karbapenemaze koji razgrađuje karbapeneme, širokospektralne antibiotike koji čini jednu od zadnjih linija antimikrobne obrane. Stoga su stariji lijekovi, kao što su kolistin i fosfomicin, koji su se u prošlosti rijetko primjenjivali zbog problema u pogledu učinkovitosti i/ili toksičnosti, zajedno s novijim tigeciklinom, postali posljednji izbor u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima (9).

3.2.1.4 *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae (gonokok) je uzročnik spolno prenosive bolesti gonoreje (kapavac). Prema SZO listi prioriternih bakterija otpornih na antibiotike, gonokok spada u bakterije visokog prioriteta (Slika 1). Gonokok može kolonizirati različite sluznice kao što su uretra, endocerviks, ždrijelo, konjunktiva i rektum. Zabrinjavajuća je sposobnost bakterije stjecanje rezistencije na antibiotike poput kinolona i treće generacije cefalosporina. U muškaraca, gonoreja se manifestira simptomima poput uretritisa i dizurije, i pojavom žutog i gustog iscjetka iz uretre. Infekcija može proći asimptomatski ili ostaviti kronične probleme u vidu uretralnih striktura. U žena, gonoreja zahvaća primarno endocerviks šireći se pritom u uretru i vaginu s karakterističnim mukopurulentnim iscjetkom. Bolest se može širiti vertikalno u maternicu, jajovode i zdjelicu uzrokujući difuznu upalu zdjelice. Neplodnost se javlja u 20% žena koje su preboljele gonokokni salpingitis dok su kronični gonokokni cervicitis i proktitis često asimptomatski.

3.2.1.5. *Haemophilus influenzae*

H. influenzae najčešće kolonizira sluznicu gornjeg dišnog sustava. *H. influenzae* je uz pneumokoka i *Moraxella catarhalis* najčešći bakterijski uzročnik upale srednjeg uha i akutnog sinusitisa. Osobe s oštećenim mukocilijarnim klirensom, kao što su pušači, ljudi s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću ili cističnom fibrozom, imaju veću vjerojatnost za razvoj infekcije donjeg dišnog sustava kao što su bronhitis i upala pluća. Posjedovanje kapsule bakteriji daje dodatan činitelj virulencije. Inkapsulirane (tipizirane) bakterije mogu ući u krvotok i putovati do moždanih ovojnica, što dovodi do meningitisa, ili se nastaniti u zglobovima i uzrokovati septični artritis. Razvoj fulminantnog opstruktivnog laringotraheitisa s natečenim epiglotisom kod male djece je alarmantno stanje koje zahtijeva brzu traheostomiju ili intubaciju kao postupak za spašavanje života (9).

3.2.2. Najznačajniji mehanizmi rezistencije gram-negativnih bakterija

3.2.2.1. Mehanizmi rezistencije na beta-laktame

U enterobakterija, pseudomonasa i acinetobaktera postoji više mehanizama rezistencije na β -laktamske antibiotike: proizvodnja enzima, prekomjerna ekspresija efluksnih pumpi i otežan ulazak antibiotika u stanicu (Slika 3). Najvažniji mehanizam rezistencije gram-negativnih bakterija je proizvodnja enzima β -laktamaza koji hidroliziraju β -laktamske antibiotike čineći ih

nedjelotvornim. Djelotvornost β -laktamaza ovisi o njihovu afinitetu za određeni antibiotik te se razlikuju penicilinaze, cefalosporinaze i karbapenemaze.

Amblerov (molekularni) sustav klasifikacije β -laktamaza dijeli ih u četiri skupine označene slovima od A-D. Beta-laktamaze u klasama A, C i D imaju aminokiselinu serin na svojim aktivnim mjestima dok enzimi klase B (poznati kao metalo-beta-laktamaze) imaju molekulu cinka na aktivnom mjestu. Klase A, B i D beta-laktamaza su klinički najznačajnije među nozokomijalnim patogenima kao što su enterobakterije.

Geni za produkciju **beta-laktamaza klase A** prenose se putem kromosoma i plazmida. Geni za enzime nazvane SME, NMC i IMI nalaze se na kromosomima dok se geni za kodiranje KPC enzima nalazi na plazmidu. U skupini A nalaze se penicilinaze i cefalosporinaze TEM, SHV i CTX koje ne hidroliziraju karbapeneme (5). Ovi enzimi razgrađuju starije generacije cefalosporina, ampicilin i amoksicilin. Pretjerana upotreba cefalosporina treće generacije dovela je do mutacija u TEM i SHV genima i omogućila prilagodbu enterobakterija. Tako su prije dvadesetak godina izolirani sojevi enterobakterija koji su producirali nove vrste enzima koji mogu razgraditi i cefalosporine treće generacije - tzv., **ESBL enzimi** (od engl. extended spectrum β -lactamases).

Najvažnija karbapenemaza klase A je **KPC** karbapenemaza koja razgrađuje većinu beta-laktamskih antibiotika, a prvi je put izolirana iz klepsijele. Geni za KPC mogu se putem plazmida prenositi i na ostale enterobakterije i pseudomonasa (5).

Beta-laktamaze klase B odnosno **metalo-beta-laktamaze (MBL)** su **karbapenemaze**, potentni enzimi koji cijepaju sve beta-laktamske antibiotike. Ovisne su o cinku, pa se mogu inhibirati kelatorom kao što je EDTA. MBL enzimi nisu inhibirani inhibitorima beta-laktamaza kao što su avibaktam, tazobaktam i sulbaktam. Geni koji kodiraju metalo-beta-laktamaze SPM, GIM, IMP,

VIM, SIM i NDM nalaze se na kromosomima, ali se mogu pronaći i na prenosivim genskim elementima. **MBL** su prvi puta izolirane u pseudomonasa i acinetobaktera, danas su proširene širom svijeta, a zabrinjava epidemijski potencijal NDM-1 beta-laktamaze unutar enterobakterija.

Beta-laktamaze klase D također se nazivaju enzimima tipa **OXA** zbog njihove sposobnosti da hidroliziraju oksacilin. Na enzime u ovoj skupini varijabilno utječu inhibitori beta-laktamaze klavulanat, sulbaktam ili tazobaktam. Od mnoštva enzima koji spadaju u beta-laktamaze grupe D najvažnije je istaknuti pet enzima čiji se geni nalaze na plazmidima; OXA-48, OXA 24/OXA-40, OXA-23, OXA-143 i OXA-58 te OXA-51 čiji se geni nalaze na kromosomu (3, 7).

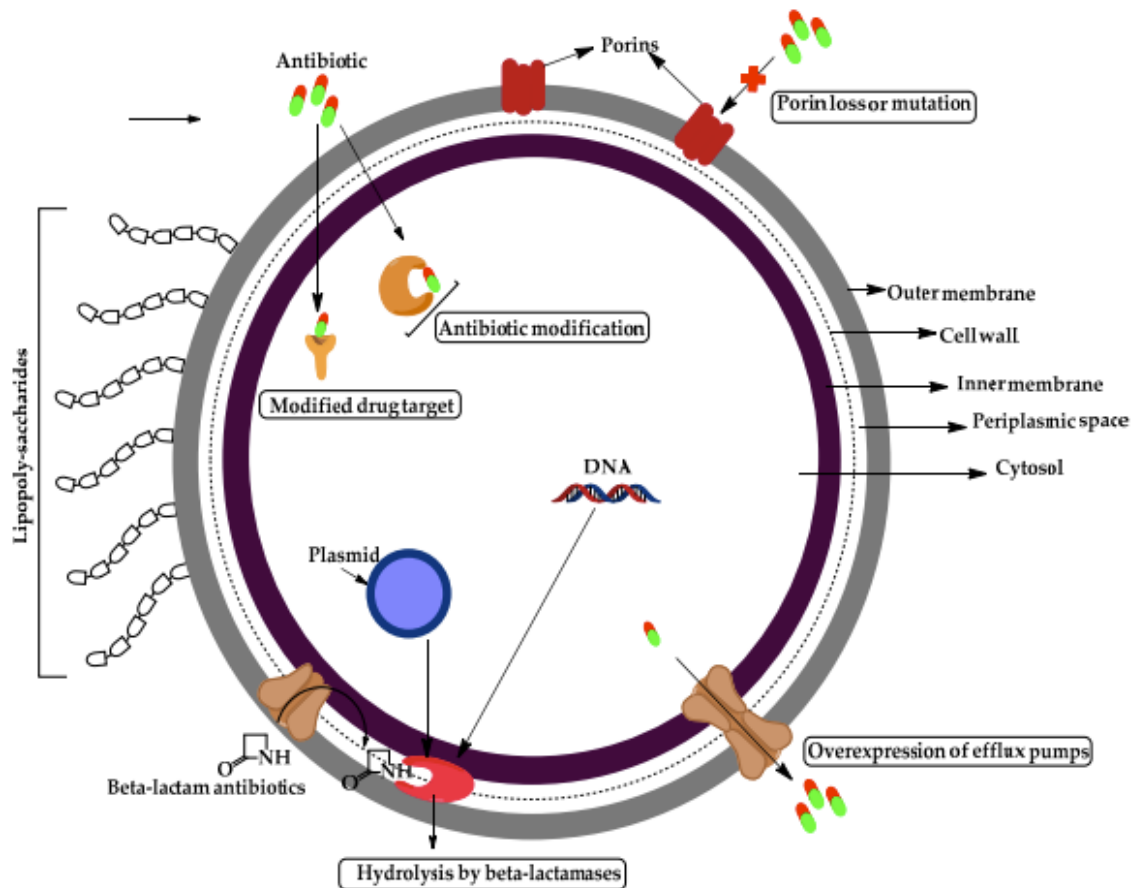
Iako su mnogi članovi klase D kromosomski, diseminacija plazmidima prenosivih cefalosporinaza u pseudomonasa, a u novije vrijeme i širenje enzima koji hidroliziraju karbapeneme u acinetobaktera i u enterobakterija (osobito *K. pneumoniae* OXA-48 producirajuća), povećao je klinički značaj ove klase.

A. baumannii, bakterija poznata po svojoj sposobnosti integracije strane DNA u svoj genetski materijal, posjeduje sve četiri kategorije β -laktamaza: A, B, C i D. Neki od ovih enzima su β -laktamaze uskog spektra poput TEM-1, SCO-1 i CARB-4, dok drugi mogu smanjiti osjetljivost na karbapeneme (GES-11, CTX-M). K tome, *A. baumannii* također posjeduje i četiri grupe efluks pumpi: MATE, RND, MFS i SMR. Dodatno, promjene permeabilnosti stijenke uslijed smanjene ekspresije porina poput Caro, Omp 22-33 dovodi do rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme. Učestala primjena kolistina za liječenje infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim acinetobakterom dovela je do selekcije sojeva sa smanjenom ekspresijom LPS-a koji zbog narušenog integriteta vanjske membrane razvijaju rezistenciju na antibiotik zadnje linije - kolistin.

Danas su u bolničkim ustanovama širom svijeta sve učestaliji izolati pseudomonasa rezistentnog na karbapeneme. Učestala je i rezistencija pseudomonasa na aminoglikozide koja je posredovana prijenosnim modificirajućim aminoglikozidnim enzimima (AME) koji su podijeljeni u 3 grupe: aminoglikozid fosforil transferaze (APH), aminoglikozid adenilil transferaze (AAD) i aminoglikozid acetiltransferaze (AAC). Ovi enzimi, dodavanjem fosfatnog, adenilnog ili acetilnog radikala u molekulu antibiotika čine aminoglikozidne antibiotike neaktivnima. Modifikacija antibiotika smanjuje njegovu sposobnost da se učinkovito veže za cilj unutar bakterijskih stanica.

Klinički najvažnije rezistencije bakterije *N. gonorrhoeae* su rezistencija na cefalosporine treće generacije te rezistencija na fluorokinolone. Rezistencija na cefalosporine treće generacije temelji se na posjedovanju četiri glavnih mehanizama. Promjena ekspresije u *penA* genu dovodi do izmjene u strukturi PBP2 proteina što doprinosi rezistenciji na cefalosporine. Nadalje, formiranje mozaične *penA* forme promjenom istoimene transpeptidazne domene doprinosi smanjenje osjetljivosti *N. gonorrhoeae* na cefeksim. Mutacija u *mtrR* genu dovodi do pojačane aktivnosti MtrC-D-E sistema koji aktivno izbacuje antibiotike van stanice. Naposljetku, mutacija *penB* gena za porin u vanjskoj membrani mijenja strukturu i funkciju samog porina smanjujući tako permeabilnost vanjske membrane za antibiotike.

Kinoloni utječu na aktivnost DNA giraze i topoizomeraze IV. Otpornost na ciprofloksacin je posredovana mutacijama u regiji koja određuje rezistenciju na kinolone (QRDR), jedna ili više mutacija u aminokiselinama u *gyrA* pozicijama 91, 95 i 102, i točkasta mutacija u *parC* genima koji kodiraju za proteine DNA giraze i topoizomeraze IV doveli su do povećanja otpornosti najserije na ciprofloksacin.



Slika 2. Građa Gram-negativnih bakterija i mehanizmi njihove rezistencije.

(Izvor: Breijyeh Z. i sur. 2020) (4)

Učestala primjena kolistina za liječenje infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim enterobakterijama postepeno dovodi do zabrinjavajuće selekcije rezistentnih sojeva. Intrinzična otpornost na kolistin prisutna je u nekim vrstama enterobakterija kao što su *S. marcescens* i *Proteus mirabilis*. Dodavanje specifičnih kationskih skupina na lipidnu membranu ovih bakterija smanjuje vezanje kolistina i rezultira otpornošću. Stečena rezistencija uočena je kod bakterija kao što su *Enterobacter*, *E. coli*, *Salmonella* i *K. pneumoniae* kroz kromosomske modulacije slične prirodno rezistentnim sojevima. Ove modulacije uključuju aktivaciju različitih operona i gena odgovornih za modifikacije u LPS membrani, uključujući dvokomponentne sustave PhoPQ i PmrAB. Utvrđeno

je da mutacije u genima kao što su PmrA, PmrB, PhoP, PhoQ i CrrB daju stečenu otpornost na kolistin (8). Ostali mehanizmi rezistencije na kolistin uključuju mutacije u genima povezanim sa sintezom LPS-a, promjene u formiranju sloja kapsule i aktivaciju sustava efluks pumpe kao što su KpnEF, AcrAB i Sap proteini (8). Otpornost posredovana plazmidima također je uočena s pojavom gena sličnih *mcr*, posebice *mcr-1* i njegovih varijanti, koji su kodirani prijenosnim genetskim elementima, plazmidima. Ovi geni kodiraju fosfoetanolamin (pEtN) transferazu i modificiraju LPS što dovodi do otpornosti. Geni *mcr* koji nose rezistenciju na kolistin pronađeni su u raznim gram-negativnim bakterijama i otkriveni u različitim okruženjima, uključujući ljude, životinje i hranu.

3.3 Dijagnostičke metode za otkrivanje rezistencije

Postoji više različitih fenotipski i genotipski baziranih metoda za detekciju antimikrobne rezistencije. Najčešće korištene metoda u kliničkoj praksi su primjena testova za fenotipsku detekciju (**disk-difuzijska i dilucijske metode, E-test**), a sve se više koriste i **molekularne metode** za detekciju specifičnih gena rezistencije, osobito ESBL gena i gena za produkciju karbapenemaza.

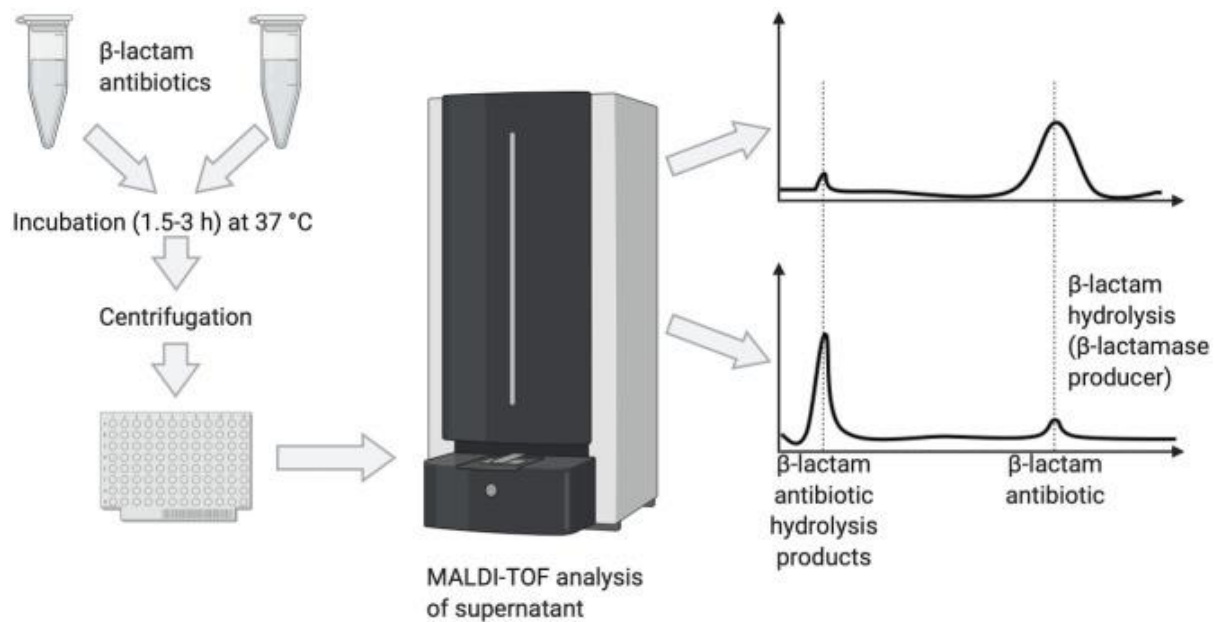
Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST) svake godine ažurira smjernice za testiranje antimikrobne osjetljivosti u kojima se definirane granične vrijednosti ili prijelomne točke za pojedinu bakteriju i antibiotik. Većina kliničkih izolata enterobakterija ima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) karbapenema ispod graničnih vrijednosti. Svaka izolacija soja s povišenim MIC vrijednostima treba pobuditi sumnju da bakterije sadržavaju karbapenemaze te je

potrebno provesti daljnje testiranje fenotipskim (**imunokromatografskim**) ili molekularnim metodama kako bi se utvrdila vrsta karbapenemaze.

Nefermentirajuće bakterije kao su pseudomonas i acinetobakter često mogu postati otporne na karbapeneme i bez stjecanja karbapenemaza. Ipak, sumnju na postojanje MBL enzima i OXA enzima treba razmotriti u regijama gdje su ti enzimi prisutni, posebno za izolate koji pokazuju visoku otpornost na karbapeneme, cefalosporine i peniciline.

Za probir sojeva koji sintetiziraju karbapenemaze može se koristiti zasijavanje na **komercijalna kromogena hranilišta** koji sadrže karbapeneme. Poznavanje činjenice da EDTA kelira ione metala te tako inhibira MBL enzime koristi se za izvođenje nekoliko različitih dijagnostičkih testova za detekciju MBL enzima: test sinergije dvostrukog diska upotrebom karbapenema i EDTA diskova, diskovi karbapenema sa i bez EDTA, MBL E-test, metoda inaktivacije karbapenema (5). Budući da su poznati geni koji kodiraju određene karbapenemaze, molekularne tehnike poput PCR i sekvenciranja (NGS) mogu se koristiti za potvrđivanje prisutnosti nekih MBL (VIM, NDM, IMP), KPC i OXA karbapenemaza.

Primjena površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (**SERS**) kao vrlo osjetljive metode za brzo i isplativo otkrivanje rezistencije na antibiotike ima veliki potencijal za kliničku primjenu. Zbog mogućnosti detekcije jedinstvenih molekularnih obrazaca, SERS je korišten za razlikovanje bakterijskih sojeva koji su otporni ili osjetljivi na antibiotike, nudeći alternativu konvencionalnim, dugotrajnim pristupima. Primjena ovog pristupa u kliničke svrhe je u uspostavi, a zasnovana je na varijacijama u biokemijskom sastavu bakterijske stanične stijenke osjetljivih i otpornih sojeva (10).



Slika 3. Slikovni prikaz MALDI-TOF analize te detekcije sinteze beta-laktamaza

(Izvor: Florio W. i sur. 2020) (11)

Jedna od novijih metoda otkrivanja beta-laktamaza producirajućih bakterija koja se sve više integrira u kliničku praksu je laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta matricom *time of flight* masena spektrometrija (**MALDI-TOF MS**). Navedena metoda koristi tehniku masene spektrometrije kako bi izmjerila količinu beta-laktama, odnosno ako je prisutan enzim koji ih razgrađuje, produkt razgradnje beta-laktamskih antibiotika. MALDI-TOF metoda vrlo je brza i pouzdana. Sve se više uvodi u kliničke mikrobiološke laboratorije za identifikaciju bakterija i otkrivanja ne samo ESBL producirajućih bakterija, nego i za detekciju sojeva koje sintetiziraju karbapenemaze i ostale enzime koji razgrađuju antibiotike. Iako navedena metoda pruža gotovo 100% osjetljivost i specifičnost te je vrlo brza i pouzdana, reagensi za dijagnostiku nisu još široko dostupni u Europi te su njihove cijene vrlo visoke.

Znatno su dostupniji i jeftiniji reagensi za imunokromatografsku detekciju rezistencije. Tako su komercijalni *lateral flow* (LF) testovi različitih proizvođača koji se koriste za detekciju različitih karbapenemaza našli svoju primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi (12).

3.4 STRATEGIJE ANTIBIOTSKOG LIJEČENJA GRAM-NEGATIVNIH INFEKCIJA

Liječenje pacijenta koji boluje od bakterijske zarazne bolesti obično uključuje primjenu antibiotske terapije koja može biti empirijska ili ciljana. Ako se radi o životno ugrožavajućoj infekciji, kao što je sepsa ili meningitis, ili o kritičnom bolesniku, starije životne dobi i brojnim komorbiditetima obično se kreće s empirijskom terapijom dok se u ostalim situacijama uglavnom čeka ishod mikrobiološke dijagnostike. Iako empirijska terapija može biti dobro odabrana, u slučajevima kada se radi o uzročniku koji stvara biofilm, kao što je to često slučaj s *pseudomonasom*, terapijski odgovor neće biti dobar zbog zaštićenosti bakterije unutar biofilma (13).

3.4.1. Konvencionalni pristup liječenju i kombinirana terapija

Sve veća pojava vrsta otpornih na karbapeneme dovela je do ponovne upotrebe baktericidnog antibiotika širokog spektra - **kolistina**, unatoč poznatim rizicima nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti. Kolistin se najčešće koristi za liječenje gram-negativne nozokomijalne pneumonije. U novije vrijeme sve je veća pojava rezistencije na kolistin u nekih bakterija, kao u

slučaju *E. coli*, koja se javlja putem *mcr-1* gena što ograničava njegovu primjenu. Kombinacije s kolistinom se često koriste za liječenje infekcija uzrokovanih MDR acinetobakterom. Istraživanja su pokazala da je monoterapija kolistinom inferiorna kombinaciji kolistina s karbapenemom i kombinacijama kolistina s tigeciklinom, aminoglikozidima ili fosfomicinom (14).

Uz kolistin i **fosfomicin** je stari antibiotik koji se ponovo počeo koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih MDR izolatima. Fosfomicin se koristi desetljećima, a najviše za liječenje infekcija urinarnog trakta. Fosfomicin inhibira sintezu stanične stijenke na drugačiji način nego beta-laktamski antibiotici, ali za razliku od njih nije toliko učinkovit u liječenju gram-negativnih infekcija. Sve veća rezistencija povećava kliničku upotrebu fosfomicina. Fosfomicin je posebno djelotvoran protiv *E. coli* kao i nekih bakterija otpornih na karbapeneme. Kao peroralni pripravak koristi se za infekcije mokraćnog sustava uzrokovane s *E. coli*, a kao parenteralni pripravak i za kombinirano liječenje uzrokovano MDR izolatima enterobakterija. Najčešće nuspojave su hipokalemija uz hipernatrijemiju te se ne preporučuje u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem.

Tigeciklin se također obično koristi u kombinaciji s drugim antibioticima. Iako pokazuje aktivnost protiv enterobakterija i acinetobaktera otpornih na karbapeneme nije učinkovit protiv pseudomonasa. Kao monoterapija preporučuje se samo u slučajevima MDR infekcija kože i mekih tkiva te u gastrointestinalnim infekcija dok se za nozokomijalne pneumonije najčešće koristi u kombinaciji s drugim lijekovima. Acinetobakter razvija rezistenciju na tigeciklin putem prekomjerne ekspresije efluksne pumpe AdeABC zbog čega se rijetko koristi u monoterapiji (3).

Aminoglikozidi su vrlo djelotvorni u urinarnom traktu, ali su manje djelotvorni za liječenje infekcija mekog tkiva i abdomena zbog ograničenog prodiranja u tkivo (14). Koriste se također za liječenje gram-negativne nozokomijalne pneumonije te se u novije vrijeme sve više koriste za

liječenje infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim gram-negativnim bakterijama. Zbog brojnih mehanizama koji doprinose rezistenciji na aminoglikozide rijetko se daju u monoterapiji te se obično daju u kombinaciji s drugim antibioticima.

Ceftazidim/avibaktam je nova kombinacija cefalosporina treće generacije ceftazidima i novijeg inhibitora beta-laktamaza, avibaktama, za indikacije poput nozokomijalne pneumonije, pijelonefritisa te bakterijemije. Kombinacija ceftazidim/avibaktam pokazala je odličnu učinkovitost u liječenju infekcija uzrokovanih MBL-producirajućim enterobakterijama. Ponekad se koristi u kombinaciji s drugim antibioticima poput karbapenema, aminoglikozida i kolistina (15).

Cefoperazon/sulbaktam *in vitro* pokazuje visoku učinkovitost u liječenju infekcija uzrokovanih enterobakterijama. Za razliku od monoterapije tigeciklinom, kombinirana terapija cefoperazon/sulbaktam pokazuje značajno manju smrtnost u liječenju infekcija uzrokovanih acinetobakterom rezistentnim na karbapeneme.

Kombinacija **ampicilina i sulbaktama** pokazuje učinkovitost prema rezistentnim acinetobakterima, a novija kombinacija **ceftolozan-tazobaktam** se primjenjuje u liječenju abdominalnih infekcija i pijelonefritisa uzrokovanog MDR izolatima pseudomonasa (16).

Kombinacija dvaju karbapenema (ertapenem s meropenemom ili s doripenemom) pokazala je uspješnost u liječenju infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnom (KR) *K. pneumoniae*. U liječenju infekcija uzrokovanih KR *K. pneumoniae* koristi se i kombinacija karbapenema i kolistina, koja se pokazala nešto uspješnijom nego kombinacija tigeciklina i kolistina.

Zadnjih nekoliko godina u kliničku su upotrebe ušle kombinacije karbapenema s IBL: **imipenem-relebaktam** i **meropenem-vaborbaktam**. Dodatak relebaktama značajno poboljšava aktivnost imipenema protiv većine vrsta enterobakterija ovisno o prisutnosti ili odsutnosti enzima β -

laktamaze. Dodatak relebaktama također poboljšava aktivnost imipenema protiv pseudomonasa, ali ne pokazuje poboljšani učinak na acinetobakter. Slično imipenem-relebaktamu, dodatak vaborbaktama značajno poboljšava aktivnost meropenema protiv većine vrsta enterobakterija. Ograničeni podaci sugeriraju da dodavanje vaborbaktama ne poboljšava aktivnost meropenema protiv acinetobaktera i pseudomonasa (15).

Neki od novih antibiotika u kliničkoj praksi su **eravaciklin**, **plazomicin** i **cefiderokol**. Eravaciklin je tetraciklinski antibiotik djelotvoran za liječenja MDR infekcija – uzrokovanih ESBL producirajućim enterobakterijama te intraabdominalnih infekcija uzrokovanih MDR acinetobakterom. Iako se u kliničkim studijima, eravaciklin pokazao jednako efikasan kao i meropenem i ertapenem uzrokovao je i nuspojave poput mučnine, povraćanja te alergijske reakcije.

Polusintetski aminoglikozidni antibiotik plazomicin se koristi u liječenju kompliciranih infekcija mokraćnog sustava uzrokovanih enterobakterijama. Pokazalo se u *in vitro* uvjetima kako je plazomicin efektivniji od aminoglikozida, no radi osjetljivosti na ribosomnu RNA metiltransferazu nije djelotvoran protiv nefermentirajućih gram-negativnih bakterija.

Cefiderokol je novi širokospektralni cefalosporin koji se koristi za liječenje kompliciranih urinarnih infekcija uzrokovanih MDR gram-negativnim bacilima (*P. aeruginosa*, *Enterobacterales* i *A. baumannii*) zbog njegove otpornosti na klase A, B, C i D karbapenemaza. Može se također koristiti za liječenje pneumonije i sepse uzrokovanih enterobakterijama.

DCAP je antibiotik širokog spektra koji se koristi za liječenje gram-pozitivnih i gram-negativnih infekcija uključujući i *E. coli* i *P. aeruginosa*. Djelovanje se zasniva na oštećenju bakterijske membrane - poticanjem prijenosa iona kroz membranu uzrokuje smanjenje membranskog

potencija te lizu stanice i povećavanje permeabilnosti membrane. Vrlo je pogodan za liječenje infekcija uzrokovanim biofilmom (7, 17).

3.4.2. Novi pristupi liječenju

Smanjenje djelotvornosti antibiotika dovelo je do istraživanja alternativnih pristupa liječenju infekcija. Ne-antibiotski pristupi liječenju najčešće su samo dodatak antibiotskoj terapiji te mogu potpomoći ili pojačati djelovanje antibiotika. Antibiotski adjuvansi sami za sebe nemaju antibiotsku aktivnost ali u kombinaciji sa antibiotikom pojačavaju njegov učinak. U antibiotske adjuvanse spadaju inhibitori beta-laktamaza koji su već dugo godina u kliničkoj primjeni. Iako pokazuju *in vitro* učinkovitost novi adjuvansi kao što su **inhibitori efluks pumpe** te **permeabilizatori membrane** još uvijek nisu ušli u klinička ispitivanja.

Bakteriofagi su sve više predmeti istraživanja te postoji nekoliko kliničkih studija koje su ispitivale kliničku primjenu bakteriofaga poput Biophage-PA za liječenje kroničnog otitisa uzrokovanog *P. aeruginosa* i T4-like kolifaga za liječenje akutnih dijareja uzrokovanih *E. coli*. Također, istražuje se upotreba koktela različitih bakteriofaga poput PhagoBurn koji sadrži 12 različitih bakteriofaga za liječenje opekline inficiranih pseudomonasom. Neki antibiotici poput ciprofloksacina pokazuju sinergistički učinak s bakteriofagima u liječenju infekcija uzrokovanim pseudomonasom.

Uz bakteriofage, noviji ne-antibiotski pristupi liječenju uključuju primjenu kemijskih tvari koje imaju antimikrobno djelovanje, a nisu antibiotici, poput peptidnih benzimidazola, Quorum Sensing inhibitora te antibakterijskih kemijskih tvari baziranih na metalima.

Spojevi koji sadrže **benzimidazol** imaju sposobnost inhibicije peptidne deformilaze (PDF) remeteći sintezu proteina u *E. coli* i *P. aeruginosa* (18). PDF je atraktivna meta za antimikrobne lijekove zbog svoje visoke očuvanosti i prisutnosti u raznim bakterijskim vrstama, a nije značajan za funkciju stanice sisavaca.

Bakterijska kemijska komunikacija, također poznata kao quorum sensing (QS), je fenomen kojim bakterije koordiniraju ekspresiju svojih gena kao kolektivna populacija kako bi regulirale različite procese kao što je osjetljivost na antibiotike i stvaranje biofilmova. QS komunikacija se zasniva na djelovanju malih molekula poznatih kao autoinduktori. Korištenjem analoga komunikacijskih molekula s različitom strukturom može se ometati komunikacija između bakterija uz posljedično antibiotsko djelovanje.

Metali koji se koriste kao antimikrobna sredstva uključuju rutenij, galij, bizmut, srebro i bakar. Ovi se metali intenzivno koriste zbog svojih antimikrobnih svojstava. Snažno antibakterijsko djelovanje protiv gram-negativnih bakterija kao što je *E. coli* i određenih MDR sojeva pokazuju luminescentni dinuklearni Ru(II) derivati. Pokazano je antibakterijsko djelovanje galijeve protoporfirina IX protiv pseudomonasa, klepsijele i acinetobaktera.

Bizmut se primjenjuje u liječenju infekcija uzrokovanih *Helicobacter pylori*. Spojevi na bazi srebra, uključujući srebrni sulfadiazin, još uvijek se koriste protiv višestruko rezistentnih sojeva *pseudomonasa*, *E. coli* i *Salmonella enterica* (19). Ioni bakra primijenjeni u visokim koncentracijama pokazuju inhibitoran učinak na rast bakterija stvaranjem, za bakterije toksičnih

kisikovih radikala. Nadalje, primijećeno je da bakar ima sinergistički učinak kada se koristi u kombinaciji s određenim antibioticima, osobito u kombinaciji s kinolonima. Nano čestice bakra pokazale su snažno antibakterijsko djelovanje protiv gram-negativnih bakterija, a učinkovitost se pripisuje njihovoj sposobnosti prodiranja kroz zaštitnu vanjsku membranu bakterija (20).

3.5. Strategije za borbu protiv rezistencije

Važne strategije za borbu protiv bakterijske rezistencije u budućnosti, te za njenu kontrolu, uključuju: edukaciju zdravstvenih djelatnika, bolju kontrolu i prevenciju bolničkih infekcija, unaprjeđenje dijagnostičkih tehnika, veću dostupnost određenih lijekova te veći nadzor nad korištenjem i propisivanjem antibiotika.

Jedan od važnih koraka u borbi protiv rezistencije je brza i jeftina dijagnostika koja bi zamijenila još uvijek najviše korištenu, empirijsku terapiju. Metode identifikacije i testiranja osjetljivosti bakterija zasnovane na uzgoju bakterija vrlo su spore, za razliku od molekularnih metoda poput multipleks PCR-a i NGS-a koje skraćuju vrijeme detekcije s nekoliko dana na par sati. Ciljanim liječenjem infekcija smanjilo bi se nepotrebno korištenje širokospektralnih antibiotika i širenje AMR. Kada se koristi empirijska terapija nužno je prilagoditi izbor antibiotika lokalnoj epidemiološkoj situaciji, smjernicama za primjenu antibiotika te rezultatima nadzornih kultura / kolonizacijskoj mikrobioti bolesnika.

Trajna edukacija liječnika u primarnim i bolničkim ustanovama doprinosi boljem poznavanju antibiotika te pravilnom korištenju antimikrobne terapije u skladu s osjetljivošću bakterija.

Iako se istražuju nove kombinacije antibiotika za liječenje infekcija uzrokovanih MDR izolatima, poput kombinacija cefepim/zidebaktam ili meropenem/nacubaktam, razvoj lijekova je vrlo spor proces te se rezultati kliničkih studija često razlikuje od obećavajućih rezultata dobivenih u *in vitro* uvjetima. U slučaju pojedinih MDR infekcija, uključanje premalog broja pacijenata u kliničke studije uvelike otežava ovaj proces.

Dodatan financijski problem predstavlja znatno veća cijena novih antibiotika što otežava njihovo uvođenje u svakodnevnu kliničku praksu, naročito u slabije razvijenim zemljama. Razvoj novih vrsta lijekova teško će se realizirati bez financijskih poticaja vlada farmaceutskim tvrtkama. Bolja suradnja između javnog, akademskog i privatnog farmaceutskog sektora dovela bi do većeg interesa farmaceutske industrije za istraživanje antibiotika.

4. RASPRAVA

AMR je dinamičan proces koji se dešava kroz više generacija bakterija te se prenosi sa jedne bakterije na drugu uzrokujući tako problem u liječenju infekcija, pogotovo u bolničkim uvjetima i predstavlja veliki izazov suvremenoj medicini. Najvažnije skupine antibiotika za liječenje gram-negativnih infekcija su aminoglikozidi, fluorokinoloni, cefalosporini, karbapenemi te polimiksini. Sve je učestalija pojava MDR sojeva bakterija koje produciraju karbapenemaze postajući otporne na širokospektralne karbapeneme, jedne od posljednjih skupina antibiotika za liječenje teških infekcija. Polimiksini su također jedan od posljednjih odabira za liječenje MDR infekcija, no pojava sojeva rezistentnih na polimiksine dodatno ugrožava budućnost antimikrobne terapije. Razlikuje se nekoliko mehanizama rezistencije: razgradnja lijeka enzimatskim putem, promjena

veznog mjesta ili metaboličkog puta na koji antibiotik djeluje te smanjena permeabilnost odnosno povećano izbacivanje lijeka iz stanice. Na listi SZO „prioritetnih rezistentnih patogena“ dominiraju gram-negativni uzročnici među kojima najveću opasnost predstavljaju MDR sojevi enterobakterija, acinetobaktera i pseudomonasa. Dijagnostičke metode za otkrivanje rezistencije vrlo su važni postupci zbog toga što čine razliku između empirijske terapije i ciljane terapije smanjujući tako propisivanje nedjelotvornih ili širokospektralnih antibiotika. Za razliku od sporih, na kultivaciji zasnovanih starih metoda dijagnostike, novije brže i osjetljivije metode kao što su molekularne metode ili MALDI-TOF omogućavaju detekciju rezistencije unutar nekoliko sati.

Neprimjerena uporaba antimikrobnih sredstava kao i neodgovarajuće sprječavanje i kontrola infekcija kod ljudi i životinja glavni su uzroci povećanja razine antimikrobne otpornosti. Rastuća rezistencija bakterija na antibiotike predstavlja prijetnju globalnom zdravlju te uzrokuje visoke troškove za zdravstvene sustave. Procjenjuje se da infekcije uzrokovane rezistentnim bakterijama godišnje uzrokuju više od 35 000 smrtnih slučajeva u EU i više od 1,2 milijuna smrtnih slučajeva u svijetu (21). Komisija EU je zajedno s državama članicama u srpnju 2022. god. utvrdila da je antimikrobna otpornost jedna od triju najvećih prijetnji zdravlju u EU. Ako se ne poduzmu daljnje mjere, do 2050. god broj smrtnih slučajeva u svijetu uzrokovan AMR mogao bi se popeti iznad 10 milijuna godišnje. S ciljem usporavanja ovog trenda u lipnju 2023. god. je donesena Rezolucija Europskog parlamenta o mjerama EU-a za borbu protiv antimikrobne otpornosti (21). Budući da AMR utječe na zdravlje ljudi, zdravlje životinja i okoliš, jedan od načina djelovanja unutar EU je primjena pristupa „**jedno zdravlje**“. Ovaj pristup potiče suradnju među sektorima zdravlja ljudi, zdravlja životinja, hrane, otpadnih voda i okoliša te ističe potrebu nadzora i praćenja primjene antibiotika u veterini i prehrambenoj industriji. Onečišćenje okoliša zbog bolničkih i komunalnih otpadnih voda ima važnu ulogu u razvoju i širenju AMR te predstavlja ključan dio rješenja

problema (21). Dobra prevencija i kontrola infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi u bolnicama i ustanovama za dugotrajnu skrb također može pridonijeti borbi protiv AMR. Neuspjeh u razvoju i proizvodnji djelotvornih novih antibiotika pogoršava posljedice antimikrobne otpornosti. Potrebno je na nacionalnoj i globalnoj razini promicati istraživanja i razvoj novih antimikrobnih sredstava i alternativa za njih. Informiranje i osposobljavanje djelatnika u zdravstvenom, veterinarskom i poljoprivrednom sektoru o AMR, sprječavanju i kontroli infekcija te pristupu „jedno zdravlje” imaju važnu ulogu u borbi protiv AMR.

5. ZAKLJUČCI

1. Rastuća rezistencija na antibiotike je globalan problem. Razvija se brže od pronalaska novih lijekova te se mora usporiti njezino širenje da bi produžili djelotvornost postojećih antibiotika.
2. Rezistencija na antibiotike posljedica je neracionalna uporaba antibiotika, loše organizirane prevencije i kontrole infekcija, limitiranog pristupa lijekovima, cjepivima i dijagnostičkim postupcima te nedovoljne edukacije zdravstvenog osoblja i bolesnika.
3. Na listi SZO „prioritetnih bakterija“ koje zbog višestruke rezistencije hitno zahtijevaju pronalazak novih antibiotike u skupini „kritičnih“ nalaze se isključivo gram-negativne bakterije: enterobakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*.
4. Razvoj i uvođenje brze, točne i jeftine dijagnostike može omogućiti ciljanu antibiotsku terapiju i time ograničiti empirijsku primjenu širokospektralnih antibiotika.
5. U liječenju infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim bakterijama koriste se kolistin, tigeciklin i fosfomicin samostalno ili u kombinaciji s dugim antibioticima.
6. Nove terapijske mogućnosti liječenja infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim bakterijama uključuju cefiderokol te nove kombinacije s inhibitorima beta-laktamaza: ceftazidim-avibaktam, ceftolozan-tazobaktam, imipenem-relebaktam i meropenem-vaborbaktam.
7. Alternativne metode liječenja MDR infekcija (bakteriofagi, inhibicija QS i dr.) još uvijek nisu u širokoj upotrebi te je potrebno provesti kliničke studije kako bi se utvrdila njihova djelotvornost.
8. Potrebno je omogućiti pronalazak novih antibiotika s novim mehanizmom djelovanja koji su djelotvorni protiv višestruko otpornih bakterija

6. SAŽETAK

Zabrinjavajuće povećanje proširenosti višestruko rezistentnih bakterija povezano s nedostatkom novih i djelotvornih antibiotika prijetnja je globalnom zdravlju. Čimbenici koji najviše pridonose nastanku antimikrobne rezistencije su: manjak dostupnosti dijagnostičkih metoda, pretjerano propisivanje antibiotika ili propisivanje neadekvatnih antimikrobnih lijekova, pretjerano korištenje antibiotika u agrikulturi, nesrazmjer između pronalaska novih antibiotika i brzine pojave i širenja rezistencije, izostanak programa nadzora nad antibioticima te izostanak programa za kontrolu infekcija. Najvažnije skupine antibiotika za liječenje rezistentnih gram-negativnih infekcija su karbapenemi, fluorokinoloni, aminoglikozidi i polimiksini. Mehanizmi rezistencije na antibiotike su: enzimatska razgradnja lijeka, promjena ciljnog mjesta vezanja antibiotika, promjena propusnosti stanične stijenke i pojačano izbacivanje antibiotika. Neki od najvažnijih gram-negativnih uzročnika koji uzrokuju teške infekcije zbog rastuće višestruke rezistencije su enterobakterije, acinetobakter i pseudomonas. Zabrinjavajuća proširenost bakterijskih sojeva koji produciraju karbapenemaze sve više smanjuje djelotvornost širokospektralnih karbapenema. Razvoj novih antibiotika dugotrajan je proces, a novi se antibiotici pojavljuju rijetko. Jedan od najvažnijih koraka u borbi protiv rezistencije je primjena brze i jeftine dijagnostike koja bi omogućila ciljanu antibiotsku terapiju i smanjila pretjeranu i nepravilnu upotrebu antibiotika. Edukacija medicinskog osoblja i kontrola nad propisivanjem antibiotika mogu dodatno utjecati na usporavanje rastućeg problema rezistencije.

Ključne riječi: acinetobakter, antibiotici, gram-negativne bakterije, enterobakterije, pseudomonas, rezistencija, višestruko rezistentne bakterije

7. SUMMARY

The worrying increase in the spread of multidrug resistant bacteria combined with the lack of new and effective antibiotics, poses a threat to global health. The factors that contribute most to the emergence of antimicrobial resistance are: limited availability of diagnostic methods, misuse and overuse of antibiotics, overuse of antibiotics in agriculture, mismatch between the discovery of new antibiotics and the speed of emergence and spread of antibiotic resistance, lack of antibiotic control programs and poor infection prevention and control. The main antibiotic groups used to treat resistant Gram-negative infections are carbapenems, fluoroquinolones, aminoglycosides and polymyxins. The mechanisms of antimicrobial resistance fall into four main categories: enzymatic degradation of antibacterial agents, alteration of a drug target, limiting uptake of a drug and active drug efflux. Some of the most important Gram-negative pathogens causing serious infections due to increasing multidrug resistance are *Enterobacteriales*, *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. The worrying prevalence of carbapenemase-producing bacterial strains is increasingly reducing the efficacy of broad-spectrum carbapenems. The development of new antibiotics is a long-term process, and new antibiotics rarely appear. One of the most important steps in the fight against resistance is the use of faster and cheaper diagnostics that would allow directed antibiotic therapy and reduce the excessive and inappropriate use of antibiotics. Education of the healthcare workers and control over the prescription of antibiotics can help control the growing problem of resistance.

Key words: acinetobacter, antibiotics, gram-negative bacteria, enterobacteria, pseudomonas, resistance, multi-resistant bacteria

8. LITERATURA

1. World Health Organization [Internet]. Antimicrobial resistance. [citirano 20.05.2023.]
Dostupno na: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
2. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15-21. doi:10.1177/2049936115621709
3. Bassetti M, Garau J. Current and future perspectives in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(Suppl 4):iv23-iv37. doi:10.1093/jac/dkab352
4. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules.* 2020;25(6):1340. Published 2020 Mar 16. doi:10.3390/molecules25061340
5. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis.* 2022;75(2):187-212. doi:10.1093/cid/ciac268

6. Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg AY. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019;10:1601. doi:10.3389/fmicb.2019.01601

7. Quale J, Spelman D. Overview of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. UpToDate [Internet]. 14.4.2022. [citirano 20.05.2023.] Dostupno na: <https://www.scribd.com/document/459872452/Overview-of-carbapenemase-producing-gram-negative-bacilli-UpToDate-pdf>

8. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:677720. Published 2021 Aug 12. doi:10.3389/fmed.2021.677720

9. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrrow JH, Sakanari JA. eds. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27e. McGraw Hill; 2019.

10. Hassanain WA, Johnson CL, Faulds K, Graham D, Keegan N. Recent advances in antibiotic resistance diagnosis using SERS: focus on the "Big 5" challenges. *Analyst*. 2022;147(21):4674-4700. doi:10.1039/d2an00703g

11. Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:572909. doi:10.3389/fcimb.2020.572909
12. Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:308. doi:10.3389/fcimb.2020.00308
13. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017;10(4):369-378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007
14. Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T. Treatment Options for Carbapenem- Resistant Gram-Negative Infections. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(20-21):345-352. doi:10.3238/arztebl.2018.0345
15. Scudeller L, Righi E, Chiamenti M, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro efficacy of antibiotic combination therapy against carbapenem-resistant Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;57(5):106344. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106344
16. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S565-S575. doi:10.1093/cid/ciz830

17. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522-554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372

18. Bird MJ, Silvestri AP, Dawson PE. Expedient on-resin synthesis of peptidic benzimidazoles. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(16):2679-2681. doi:10.1016/j.bmcl.2018.04.062

19. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7202. doi:10.3390/ijms22137202

20. Djoko KY, Goytia MM, Donnelly PS, Schembri MA, Shafer WM, McEwan AG. Copper(II)-Bis(Thiosemicarbazonato) Complexes as Antibacterial Agents: Insights into Their Mode of Action and Potential as Therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6444-6453. doi:10.1128/AAC.01289-15

21. Rezolucija Europskog parlamenta od 1. lipnja 2023. o mjerama EU-a za borbu protiv antimikrobne otpornosti (2023/2703(RSP)). Dostupno na: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2023-0220_HR.html

9. ŽIVOTOPIS

Vedran Jukopila rođen je dana 24. svibnja 1998. godine u Puli. Osnovnoškolsko obrazovanje završio je u Osnovnoj školi dr. Mate Demarin u Medulinu kao učenik odlikaš. Za vrijeme pohađanja osnovne škole pokazuje snažan interes za učenjem kemije i matematike, stoga odlazi na natjecanja na kojima osvaja nagrade. Godine 2012. upisuje Gimnaziju Pula, smjer prirodoslovni-matematičar. Za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja i dalje ima izražen interes za učenjem kemije i matematike. Tijekom 2014. i 2015. god. odlazi na županijska natjecanja te pokazuje iznimno znanje i osvaja nagrade. Želja za upisom studija medicine prati ga kroz čitavo srednjoškolsko obrazovanje. Godine 2016. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, smjer Medicina, te nakon prve godine studija postaje demonstrator na Katedri anatomije. Godine 2020. postaje stipendist Istarske županije. Svoje fakultetske dane završava 2023. god. kada se vraća u rodni grad.