

Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze

Bubonja-Šonje, Marina; Abram, Maja

Source / Izvornik: **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2014, 50, 128 - 149**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:520953>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-05**



Repository / Repozitorij:

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



Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze

Global spread of carbapenemase-producing bacteria

Marina Bubonja-Šonje^{1*}, Maja Abram²

¹Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju, KBC Rijeka, Rijeka

²Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Primljeno: 24. 3. 2014.

Prihvaćeno: 1. 4. 2014.

Sažetak. Klinički značaj enzima karbapenemaza očituje se u njihovoj sposobnosti hidrolize karbapenema, zbog čega bakterije koje ih proizvode razvijaju otpornost na ovu podskupinu β-laktamskih antibiotika širokog spektra, kao i na većinu ostalih pripadnika iste skupine (penicilini, cefalosporini). Karbapenemaza producirajući sojevi gram-negativnih bakterija od velikog su epidemiološkog značaja, budući da trend širenja ovih β-laktamaza među bolničkim, ali i izvanbolničkim izolatima postaje ozbiljna globalna prijetnja. Često uzrokuju manje ili veće epidemije u zdravstvenim ustanovama. Geni koji kodiraju karbapenemaze obično se prenose na druge bakterije zajedno s genima koji su odgovorni za rezistenciju na ostale skupine antibiotika, kao što su kinoloni i aminoglikozidi. Među najproširenijim karbapenemazama nalaze se metalo-β-laktamaze IMP, VIM i NDM-tipa, a početkom trećeg milenija postali smo svjedoci globalne krize zbog eksplozivnog širenja višestruko otporne *Klebsiella pneumoniae* koja proizvodi KPC β-laktamazu. Zabrinjava činjenica da pojava i širenje enterobakterija, pseudomonasa i acinetobaktera otpornih na karbapeneme značajno pridonosi povećanom pobolu i smrtnosti pacijenata. Za probir karbapenemaza producirajućih sojeva u mikrobiološkom laboratoriju koriste se klasične fenotipske metode zasnovane na kultivaciji, nakon čega je neophodno potvrditi produkciju enzima primjenom potvrdnih (fenotipskih i/ili molekularnih) metoda. Identifikacija specifičnih gena koji kodiraju enzime temelji se na molekularnim tehnikama. Dijagnostiku i interpretaciju dobivenih laboratorijskih rezultata otežava neprepoznavanje rezistencije nižeg stupnja koja se može javiti u određenom postotku karbapenemaza producirajućih sojeva. Zbog vrlo ograničenog izbora djelotvornih antibiotika vrlo je značajno rano otkrivanje producirajućih sojeva te sprječavanje njihova prijenosa. Pravovremeno otkrivanje inficiranih pacijenata, ali i zdravih kliconoša ključan je korak u prevenciji širenja rezistentnih sojeva bakterija.

Cljučne riječi: antimikrobna rezistencija; gram-negativne bakterije; karbapenemaze; karbapenemi

Abstract. Carbapenemases are clinically important enzymes because they hydrolyse and inactivate the broad-spectrum β-lactam antibiotics carbapenems. Carbapenemase-producing strains are resistant to carbapenems and to most of the other classes of β-lactams (penicillins, cephalosporins). The growing trend of the carbapenemase-producing strains between inpatient and outpatient isolates of gram-negative bacteria is becoming a global health threat. Infections caused by carbapenemase-producing strains often occur as outbreaks. In addition, carbapenemase-encoding genes are frequently transferred to other bacteria along with the genes responsible for resistance to other classes of antibiotics, such as quinolones and aminoglycosides. The most widespread carbapenemases are metallo-β-lactamase IMP, VIM and NDM-types. At the beginning of the third millennium we witnessed the global spread of KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The emergence and spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains leads to an increase in morbidity and mortality rates. Phenotypic methods based on cultivation are used for screening of carbapenemase-producing strains, however, enzyme production must be confirmed by phenotypic or molecular methods. Identification of specific carbapenemase-encoding genes is mainly based on molecular techniques. Low level resistance that can occur in a certain percentage of carbapenemase-producing strains complicates detection and laboratory tests interpretation. Due to the very limited choice of effective antibiotics early detection of carbapenemase-producing strains becomes of paramount importance. Strict infection control measures, including active surveillance for timely detection of colonised patients and prompt isolation of carriers are key steps for preventing the transmission of these bacteria in healthcare settings.

Key words: antimicrobial drug resistance; carbapenemase; carbapenems; gram-negative bacteria

***Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Marina Bubonja-Šonje, dr. med.
Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju,
KBC Rijeka
Krešimirova 42, 51 000 Rijeka
e-mail: marina.bubonja@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Karbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem) su β -laktamski antibiotici širokog spektra tradicionalno smatrani prvom linijom obrane protiv najtežih infekcija uzrokovanih otpornim sojevima gram-negativnih bacila. Antimikrobni učinak ostvaruju vezanjem na različite proteine koji vežu penicilin (engl. *penicillin binding protein*; PBP) stanične stijenke gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, sprječavajući tako sintezu peptidoglikana i dovodeći do lize bakterijske stanice. Prvi otkriveni karbapenem je tienamicin, metabolički produkt streptomyceta iz kojega su kasnije izvedeni polusintetski i sintetski derivati. Najvažniji mehanizam otpornosti na β -laktamske antibiotike je proizvodnja enzima β -laktamaza. Podrijetlom nastali od staničnih PBP enzima, kao što su transpeptidaze i karboksipeptidaze, ovi su enzimi naknadno stekli sposobnost hidrolize β -laktamskog prstena i inaktivacije β -laktama¹. Naime, evolucija β -laktamaza predstavlja izrazitu prednost za preživljavanje bakterija. Za razliku od ostalih β -laktamskih antibiotika, kao što su penicilini i cefalosporini, karbapenemi su stabilni prema većini β -laktamaza, izuzev kromosomskih karbapenemaza koje proizvode *Stenotrophomonas maltophilia* i neki sojevi *Bacteroides fragilis*. Stabilnost im omogućava specifična stereokemija postraničnog lanca u odnosu na klasične β -laktamske antibiotike². Iako i *Acinetobacter baumannii* ima gen koji kodira prirodenu karbapenemazu OXA-51-like, do smanjene osjetljivosti na karbapeneme dolazi samo u slučaju pojačane genske ekspresije. Sve veća učestalost infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje proizvode β -laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamases*; ESBL) dovela je do povećane upotrebe karbapenema kao antibiotika posljednje linije obrane u liječenju ovih infekcija. Naime, karbapenemi su otporni na djelovanje ESBL enzima koji hidroliziraju treću generaciju cefalosporina. Devedesetih godina prošlog stoljeća opisane su prve enterobakterije otporne na karbapeneme čija je otpornost posredovana kromosomski kodiranim β -laktamazama nazvanim karbapenemazama³. Nedugo zatim u SAD-u su se pojavili otporni sojevi *Klebsiella pneumoniae* koji

nose prenosive gene za karbapenemaze smještene na plazmidima⁴. Ipak, otpornost enterobakterija na ovu skupinu antibiotika ostala je sporadična sve do početka trećeg milenija, kada smo postali svjedoci globalne krize zbog brzog širenja višestruko otpornih sojeva *K. pneumoniae* (engl. *multi drug resistant*; MDR) koji proizvode plazmidima kodirane karbapenemaze. Zabrinjava činjenica da pojava i širenje gram-negativnih bakterija otpornih na karbapeneme, uključujući *P. aeruginosa*, *A. baumannii* te pripadnike obitelji *Entero-*

Karbapenemaza producirajući sojevi gram-negativnih bakterija otporni su na većinu β -laktama, a često su otporni i na druge skupine antibiotika. Trend širenja ovih β -laktamaza među bolničkim, ali i izvanbolničkim izolatima postaje ozbiljna globalna prijetnja. Problem predstavlja ne samo ugrožavanje djelotvorne kliničke primjene karbapenema, već i generiranje nove skupine višestruko otpornih „superbakterija“.

bacteriaceae, značajno pridonosi povećanom pobolu i smrtnosti pacijenata.

Otpornost na karbapeneme u gram-negativnih bakterija može nastati jednim, odnosno kombinacijom nekoliko sljedećih mehanizama: (a) hiperprodukcija/derepresija β -laktamaza Amblerove molekularne skupine C (AmpC cefalosporinaze) ili produkcija ESBL enzima u kombinaciji s gubitkom ili promjenama porina vanjske membrane (smanjena propusnost bakterijske stijenke); (b) pojačano izbacivanje lijeka (pojačan efluks); (c) smanjen afinitet PBP-a; (d) proizvodnja karbapenemaza⁵. Proširenost enterobakterija otpornih na sve karbapeneme relativno je niska, iako je u stalnom porastu. Češće se izoliraju enterobakterije rezistentne samo na ertapenem, budući da je ovaj karbapenem najpodložniji hidrolizi ESBL-a ili enzimima AmpC, što uz smanjenu propusnost vanjske membrane dovodi do rezistencije. Na sreću, s iznimkom sojeva koji proizvode karbapenemaze, otpornost na karbapeneme je uglavnom nestabilna i ima tendenciju spontanog nestanka. Naime, smanjena propusnost stanične stijenke ima negativan utjecaj na preživljenje mutiranih bakterija nositelja navedenog svojstva.

Problem širenja karbapenemaza u Europi (u početku u samo nekoliko mediteranskih zemalja) datira od druge polovice 1990. godine, kada su ih uglavnom proizvodili sojevi *P. aeruginosa*. Karbapenemaze mogu biti eksprimirane u različitim stupnju, a značajno se razlikuju u biokemijskim osobinama i aktivnosti prema pojedinim β -laktamima. Ovisno o razini ekspresije, osobinama enzima i prisutnosti drugih mehanizama rezistencije (druge β -laktamaze, pojačan efluks ili promjena propusnosti membrane) sojevi koji ih proizvode mogu pokazivati širok raspon rezistentnih fenotipova. Geni za karbapenemaze često se nalaze na plazmidima ili integronima zajedno s genima koji su odgovorni za rezistenciju na ostale razrede antibiotike, kao što su kinoloni i aminoglikozidi, što značajno smanjuje izbor antibiotika dostupnih za liječenje infekcija. Kao posljedica toga karbapenemaza-producirajući sojevi *P. aeruginosa* i *A. baumannii*, te rijeđe *K. pneumoniae*, postaju u sve većem broju višestruko otporni na tri ili više različitih skupina antibiotika uz opasnost probira sojeva rezistentnih na sve dostupne antibiotike (engl. *pandrug-resistant*)⁶. Prisutnost karbapenemaza u gram-negativnih bakterija predstavlja velik problem u kliničkoj praksi zbog velike raznolikosti enzima kao i mogućnosti horizontalnog prijenosa gena rezistencije među različitim bakterijskim vrstama i rodovima. Zbog čestog smještaja *bla* gena koji kodiraju karbapenemaze na prenosivim genskim elementima, infekcije uzrokovane ovim sojevima često se javljaju u obliku epidemija u bolničkim ustanovama, staračkim domovima te ustanovama za palijativnu skrb⁷.

KARBAPENEMAZE: KLASIFIKACIJA, MOLEKULARNA RAZNOLIKOST I KLINIČKI ZNAČAJ

Karbapenemaze su složena skupina β -laktamaza koje pokazuju značajnu gensku raznolikost, ali i dijele nekoliko zabrinjavajućih osobina. Karbapenemaze inaktiviraju gotovo sve β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme. Pronađene su u enterobakterijama, pseudomonasima i acinetobakterima, a pripadaju trima Amblerovim molekularnim razredima β -laktamaza: razredima A, B i D. Molekularna klasifikacija β -laktamaza temelji

se na usporedbi nukleotidnih i aminokiselinskih sekvencija enzima. Pored revidirane klasifikacijske sheme β -laktamaza prema Ambleru još se uvijek upotrebljava i starija funkcionalna klasifikacija po Bushu i sur. koja se temelji na supstratu koji ovi enzimi hidroliziraju, kao i tvari koja ih inhibira⁸⁻¹⁰. Najviši stupanj rezistencije na karbapeneme izazivaju metalo- β -laktamaze (MBL) razreda B koje se najčešće javljaju u *P. aeruginosa*, a kodirane su prenosivim genskim elementima, kao što su integroni koji obično sadržavaju i gene rezistencije na ostale skupine antibiotika. Iako su karbapenemaze prvobitno pronađene u nefermentirajućih bakterija, sve je veći broj enterobakterija, osobito sojeva *K. pneumoniae* sa stečenim genima za karbapenemaze. Najprošireniji su MBL VIM i IMP-tipa te KPC enzimi razreda A.

Karbapenemaze molekularnog razreda A

Karbapenemaze razreda A su serinske karbapenemaze, budući da sadrže aminokiselinu serin u aktivnom mjestu enzima. Hidroliziraju širok spektar β -laktama: peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aztreonam, a inhibirane su klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. Uključuju sljedeće članove: SME (engl. *Serratia marcescens* enzyme), KPC (engl. *K. pneumoniae* carbapenemase), NmcA/IMI (engl. *not metalloenzyme carbapenemase/imipenem-hydrolysing β -lactamase*), GES (engl. *Guiana extended-spectrum*), SHV-38 (engl. *sulphydryl variable*) i SFC-1 (*S. fonticola*). Geni koji kodiraju njihovu produkciju mogu se nalaziti na kromosomu ili plazmidu. Većina karbapenemaza razreda A pronađena je isključivo u enterobakterijama (tablica 1) uz iznimku GES i KPC karbapenemaza koje su proširene i među pseudomonasima (tablica 2), a nedavno su oba enzima pronađena i u acinetobakteru (tablica 3)¹¹⁻¹⁴. Klinički i epidemiološki najznačajnija karbapenemaza iz ovog razreda je KPC.

SME-1 je kromosomski kodirana karbapenemaza opisana 1994. nakon kloniranja i analize genske sekvencije, a nađena je u dva soja *S. marcescens* izolirana deset godina ranije u Velikoj Britaniji^{15,16}. Sojevi koji luče kromosomski kodirane karbapenemaze SME-1 i gotovo identične SME-2 i SME-3, sporadično uzrokuju infekcije, a rezervoar sojeva još uvijek nije utvrđen¹⁷. Kromosomski lokus gena

i osjetljivost sojeva na cefalosporine proširenog spektra objašnjavaju sporadično pojavljivanje SME producirajuće *S. marcescens*, iako uvijek postoji mogućnost prijenosa gena na mobilne genske elemente.

Suprotno tome, tijekom posljednjeg desetljeća, ubrzo nakon prve izolacije KPC producirajućeg soja *K. pneumoniae* došlo je do naglog i globalnog širenja KPC sojeva enterobakterija, naročito *K. pneumoniae*. Iako su *bla_{KPC}* geni najčešće prisutni u enterobakterijama, mogu ih posjedovati i pseudomonasi, a nalaze se na prenosivim genskim elementima. KPC producirajući sojevi uglavnom uzrokuju sustavne bolesti, a zbog velikog epidemijskog potencijala često uzrokuju bolničke infekcije. KPC enzim nosi smanjenu osjetljivost ili otpornost na sve beta-laktame. Otpornost na pojedine karbapeneme može biti različito izražena, te minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) imipenema može varirati od 1 mg/l do > 64 mg/l. Od svih karbapenema ertapenem pokazuje najslabiji antimikrobni učinak. Vrlo brzo nakon prvog pojavljivanja *K. pneumoniae* koja na prenosivom plazmidu nosi gen za enzim KPC-1 (1996. u Sjevernoj Karolini) došlo je do eksplozivnog širenja ovog klona diljem SAD-a^{4,18}. Zabrinjavajuća je činjenica da sve veći broj zemalja u Europi prijavljuje naglo širenje KPC sojeva. Globalnim širenjem KPC sojevi enterobakterija postali su endemski prisutni u mediteranskim zemljama (Izrael, Grčka, Italija), Južnoj Americi (Kolumbija, Argentina i Brazil) i Kini¹⁹⁻²². Do danas je u svijetu pronađeno desetak varijanti KPC gena, klasificiranih od *bla_{KPC-2}* do *bla_{KPC-13}*²³. Gen za KPC-2 (kasnije je utvrđeno da je identičan genu za KPC-1) pronađen je u *K. pneumoniae* u Baltimoru, dok je KPC-3 soj uzrokovao epidemiju u New York Cityju^{24,25}. KPC-2, KPC-3, KPC-4 i KPC-10 β-laktamaze nedavno su identificirane u kliničkim izolatima *A. baumannii* u Portoriku¹⁴. U Hrvatskoj je 2011. izolirana prva KPC producirajuća enterobakterija, već tijekom 2012. bilo je 19 izolata, a 2013. broj KPC izolata enterobakterija povećao se na 33²⁶⁻²⁸. Molekularnim je metodama dokazano da se radi o epidemijском klonu ST258, inače vrlo proširenom u svijetu, koji se brzo proširio među zdravstvenim ustanovama u našoj zemlji. Zbog brzog širenja KPC sojeva Hrvatska se ubraja u zemlje četvrtog

stupnja epidemijskog širenja (regionalno širenje)²⁹.

NmcA i IMI karbapenemaze dijele 97 % homologije u slijedu sekvencija aminokiselina i izolirane su iz sojeva *Enterobacter cloacae*. Varijante enzima NmcA/IMI pronađene su sporadično u kliničkim izolatima enterobakterija, a izolacija IMI-2 producirajućih sojeva enterobakterija iz različitih rijeka u SAD-u ukazuje da se rezervoar karbapenemaza producirajućih bakterija može nalaziti u okolišu³⁰⁻³². Nedavno objavljen rad izvještava o pojavi IMI-1 soja *E. cloacae* u Hrvatskoj³³. Soj je izoliran iz brisa kirurške rane pacijenta liječenog krajem 2010. u „Magdaleni”, klinici za kardiovaskularne bolesti u Zagrebu. Zahvaljujući kromosomskom lokusu gena, ali i brzoj dijagnostici i poduzimanju mjera kontrole širenja infekcija, spriječen je prijenos soja na druge pacijente.

Prvi **GES** pozitivan izolat *K. pneumoniae* pronađen je 1998. u Francuskoj u pacijenta prethodno hospitaliziranog u Francuskoj Gvajani³⁴. Do danas ova obitelj enzima sadrži devet varijanti od kojih samo četiri (GES-2, GES-4, GES-5 i GES-6) pokazuju mjerljivu enzimatsku aktivnost prema karbapenemima. Uglavnom su pronađeni u pseudomonasi i enterobakterija dominantno u Europi, Južnoj Africi i Dalekom Istoku. Nedavno su varijante enzima GES-11, GES-12, GES-14 koje imaju sposobnost hidrolize karbapenema otkrivene u kliničkih izolata acinetobakterija u Francuskoj i Belgiji^{13,35}.

SFC i SHV skupine karbapenemaza sadrže samo po jednog člana: SFC-1 i SHV-38. Enzim SFC-1 izoliran je iz okolišnog izolata *S. fonticola* u Portugalu, a SHV-38 iz kliničkog izolata *K. pneumoniae* u Francuskoj i oba su enzima kromosomski kodirana^{36,37}.

Budući da se većina gena koji kodiraju karbapenemaze molekularnog razreda A (izuzev *bla_{KPC}* gena) nalazi na kromosomu, taj tip rezistencije nije prenosiv i ne postoji opasnost od epidemijskog širenja, kao što je slučaj kod MBL ili ESBL producirajućih sojeva.

Karbapenemaze molekularnog razreda B – metalo-β-laktamaze

Karbapenemaze razreda B su MBL koji sadrže cink u aktivnom mjestu enzima. Inhibirane su ke-

latorima metalnih iona (EDTA, merkaptopropionska kiselina) koji nemaju terapijsku primjenu, ali pomažu pri fenotipskoj detekciji sojeva u laboratorijskom radu. MBL hidroliziraju sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme, ne hidroliziraju monobaktam aztreonam i nisu inhibirane komercijalno dostupnim inhibitorima β -laktamaza kao što su klavulanska kiselina i sl. Mogu biti prisutne u fermentirajućim i nefermentirajućim gram-negativnim bacilima. Razred B karbapenemaza uključuje NDM (engl. *New Delhi metallo- β -lactamase*), VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*), IMP (engl. *imipenemase*), SPM (engl. *Sao Paulo metallo- β -lactamase*), SIM (engl. *Seoul imipenemase*), GIM (engl. *German imipenemase*), AIM (engl. *Adelaide imipenemase*), DIM (engl. *Dutch imipenemase*), KHM (*C. freundii* strain KHM243 – Kyorin Hospital MBL), SMB

(engl. *Serratia MBL*), TMB (Tripoli MBL) i FIM (engl. *Florence imipenemase*) enzime čije su pojedine varijante prisutne u enterobakterijama (tablica 1), pseudomonasu (tablica 2) i acinetobakteru (tablica 3).

NDM-1 karbapenemaza prvi put je dokazana 2008. u dva izolata *K. pneumoniae*, oba izolirana iz kliničkih uzoraka švedskog pacijenta prethodno hospitaliziranog u Indiji³⁸. Vrlo brzo nakon prve izolacije došlo je do globalnog i eksplozivnog širenja ovog MBL-a^{39,40}. NDM MBL uglavnom se nalaze u *K. pneumoniae*, ali se javljaju i u *E. coli*, *Enterobacter* spp. i drugim enterobakterijama te u acinetobakteru i pseudomonasu^{41,42}. Profil antimikrobne osjetljivosti ovih izolata je zabrinjavajući, budući da su razvili otpornost na gotovo sve dostupne antibiotike izuzev kolistina i tigeciklina^{39,43}. Sojevi pokazuju visoku razinu rezistencije

Tablica 1. Klasifikacija različitih tipova i varijanti karbapenemaza pronađenih u enterobakterijama

Molekularni razred (podjela po Ambleru)	Funkcionalna podskupina (podjela po Bush i sur.)	Otpornost (supstrat)	Varijanta enzima	Lokus gena	Literatura
A	2f	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	Nmc-A IMI-1 IMI-2 KPC-1 KPC-3 KPC-4 do KPC-11 KPC-12 KPC-13 SME-1 SME-2 SME-3 GES-4 GES-5 GES-6 SHV-38 SFC-1	K K P P P P N N N K K P P P K K	3, 141 30 32 4 25 142–148 149 150 15, 16 151 152 153, 154 155, 156 154, 157 37 36
B (B1)	3a	svi beta-laktami osim aztreonama	VIM-1 do VIM-37 IMP-1 do IMP-42	P/K P/K	63, 158* 159, 158*
D	2df	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	NDM-1 do NDM-7 KHM-1 SMB-1 OXA-48 OXA-162 OXA-181 OXA-204 OXA-232	P/K P K P P P P P	38, 158* 67 69 82 160 161 162 84

K = kromosom, P = plazmid, N = nepoznata

*pregledni članak

Tablica 2. Klasifikacija različitih tipova i varijanti karbapenemaza pronađenih u pseudomonasu

Molekularni razred (podjela po Ambleru)	Funkcionalna podskupina (podjela po Bush i sur.)	Otpornost (supstrat)	Varijanta enzima	Lokus gena	Literatura
A	2f	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	KPC-2	P	12
			KPC-5	P	163
			GES-2	P	11
			GES-5	P	164
			GES-9	K	165
			GES-13	K	166
B (B1)	3a	svi beta-laktami osim aztreonama	VIM-1 do VIM-37	P/K	56, 158*
			IMP-1 do IMP-44	P/K	49, 158*, 55
			GIM-1	P	167
			SPM-1	K	168
			AIM-1	K	66
			DIM-1	P	68
			FIM-1	K	70
D	2df	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	OXA-40	P	169
			OXA-50	K	170
			OXA-198	P	76

K = kromosom, P = plazmid, N = nepoznata

*pregledni članak

Tablica 3. Klasifikacija različitih tipova i varijanti karbapenemaza pronađenih u acinetobakteru

Molekularni razred (podjela po Ambleru)	Funkcionalna podskupina (podjela po Bush i sur.)	Otpornost (supstrat)	Varijanta enzima	Lokus gena	Literatura
A	2f	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	KPC-2	P	14
			KPC-3	P	14
			KPC-4	P	14
			KPC-10	P	14
			GES-11	P	13
			GES-14	P	35
B (B1)	3a	svi beta-laktami osim aztreonama	VIM-1 do VIM-11	P	171, 158*
			IMP-1 do IMP-19	P	172–174, 158*
			NDM-1	P	175
			NDM-2	N	175
			SIM-1	K	176
			SPM-1	N	177
			GIM-1	N	71
D	2df	karbapenemi, penicilini, cefalosporini, aztreonam	OXA-23/27	P/K	178
			OXA-24/40	P	179
			OXA-25	K	71
			OXA-26	K	71
			OXA-51	K	180
			OXA-58	P/K	181
			OXA-143	P	182
			OXA-182	N	183
			OXA-235	P	184

K = kromosom, P = plazmid, N = nepoznata

*pregledni članak

na karbapeneme, najčešće su MIK-ovi imipenema i meropenema ≥ 32 mg/l. Do danas su se NDM-1 sojevi proširili po svim kontinentima, a češći su u pacijenata s anamnestičkim podacima o putovanju ili hospitalizaciji u indijskom potkontinentu. Unatoč velikoj pozornosti medija nakon unosa NDM-1 soja u Europu s indijskog potkontinenta, aktualan broj NDM izolata u većini europskih zemalja ostao je relativno nizak u usporedbi s drugim karbapenemaza producirajućim sojevima. Od svih europskih zemalja Velika Britanija ima najveću prevalenciju, no u usporedbi s drugim karbapenemazama NDM-1 pokazuje neke zabrinjavajuće osobine od javnozdravstvenog značaja:

- prisutnost bla_{NDM-1} gena u različitim vrstama bakterija
- epidemijski potencijal bakterija koje ih najčešće produciraju (*K. pneumoniae*, tipični bolnički patogen i *E. coli*, glavni izvanbolnički patogen)
- rasprostranjenost u okolišu (barem u Indiji)⁴⁴
- veličina rezervoara (Indija ima više od 1,4 milijarde stanovnika).

Zabrinjava podatak da su u nekim dijelovima Pakistana do 20 % populacije kliconoše NDM-1 sojeva⁴⁵. Uz Indiju, Srbija i Grčka se smatraju drugim izvorom enzima NDM-1⁴⁶. Prva *K. pneumoniae* s NDM-1 karbapenemazom u Hrvatsku je stigla iz BiH 2009.⁴⁷ Do konca 2012. bilo je ukupno osam sporadičnih izolata NDM producirajućih enterobakterija, tijekom 2012. još četiri izolata, a 2013. devet NDM izolata prijavljeno je Odboru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH^{48,27,28}.

IMP-1 je prvi dokazani MBL, a pronađen je u pseudomonasu rezistentnom na karbapeneme 1988. u Japanu⁴⁹. Gen bla_{IMP} se vrlo brzo počeo širiti među sojevima pseudomonasa u drugim bolničkim ustanovama. Istraživanje je pokazalo da je translokacija gena na različite plazmide ili kromosome pomoću integrona dovela do diseminacije gena između sojeva pseudomonasa s različitim genetičkom pozadinom, te izbijanja više epidemija u Japanu⁵⁰. Od IMP producirajućih izolata pseudomonasa u Europi su opisane IMP-13 varijanta koja je uzrokovala epidemije u Italiji i Francuskoj, IMP-15 u Španjolskoj, te posljednja opisana alel-

ska varijanta, IMP-33 iz nozokomijalnih izolata iz Italije⁵¹⁻⁵⁴. Dvije najnovije varijante IMP-tipa MBL enzima; IMP-43 i IMP-44 otkrivene su prošle godine u višestruko otpornom kliničkom izolatu pseudomonasa u Japanu⁵⁵. U skupini IMP enzima trenutno postoji četrdesetak alelskih varijanti. Danas su IMP enzimi prošireni i među enterobakterijama, za razliku od VIM enzima koji su češće prisutni u nefermentirajućim gram-negativnim štapićima.

VIM-1 MBL je prvi put izoliran u Italiji 1997. iz *P. aeruginosa*⁵⁶. Pseudomonasi koji su proizvodili VIM-1 uzrokovali su epidemije bolničkih infekcija u Italiji⁵⁷. Kao i bla_{IMP} , bla_{VIM} geni su smješteni na mobilnim genskim kasetama ubačenim u integron, što osigurava velik potencijal za ekspresiju i diseminaciju u gram-negativnih bakterija⁵⁸. Do danas su sve europske sredozemne zemlje (Španjolska, Francuska, Italija, Hrvatska, Grčka, Turska) prijavile prisutnost MBL-a u *P. aeruginosa*, uglavnom VIM tipa, ali i IMP tipa (Italija i Francuska)⁵⁹. U Francuskoj je iz kliničkog izolata *P. aeruginosa* iz 1996. dokazana nova alelska varijanta VIM-2 iz, a danas je to najčešće opisan i najprošireniji MBL u Europi i svijetu⁶⁰. Do sada je pronađeno tridesetak varijanti VIM enzima u fermentirajućih i nefermentirajućih gram-negativnih štapića. U Hrvatskoj su 2000. izolirani prvi klinički izolati VIM-2 producirajućeg *P. aeruginosa*⁶¹. Izolirani VIM-2 sojevi pripadaju epidemijskom klonu proširenom u Sredozemlju, a za sada je u RH zabilježena niska prevalencija MBL producirajućih *P. aeruginosa*⁶². Godine 2001. u Grčkoj su izolirane prve enterobakterije koje proizvode VIM MBL⁶³. VIM i IMP producirajući sojevi enterobakterija danas su prošireni u Grčkoj, Italiji, Španjolskoj i Japanu^{64,65}. Od početka praćenja bakterijske rezistencije u Hrvatskoj su prisutni sporadični izolati VIM producirajućih enterobakterija, no prije tri godine uočena je učestalija pojava ovih sojeva. U RH je 2012. bilo ukupno 66 izolata VIM sojeva enterobakterija, te dva IMP producirajuća izolata, dok je 2013. izolirana 51 enterobakterija koja luči VIM karbapenemazu^{27,28}. U Hrvatskoj, barem za sada, MBL producirajući sojevi enterobakterija ne pokazuju znakove epidemijskog širenja^{48,29}.

Dok su VIM, IMP i NDM metalo- β -laktamaze globalno proširene, ostale do sada otkrivene me-

talo- β -laktamaze (**SPM, GIM, DIM, SIM, KHM, SMB, AIM, FIM**) imaju ograničenu geografsku rasprostranjenost⁶⁶⁻⁷⁰. Ovi su MBL od manjeg kliničkog značaja, budući da se od inicijalnog otkrića producirajući sojevi bakterija nisu proširili izvan granica izvorne države. Međutim, nedavno su u bolničkih izolata acinetobaktera u Egiptu pronađeni SPM-1 i GIM-1 enzimi⁷¹. Iako MBL nisu prevladavajuće karbapenemaze u *A. baumannii*, do sada su u acinetobakteru identificirani MBL obitelji IMP, VIM, SIM i NDM⁷².

Karbapenemaze molekularnog razreda C

Iako i cefalosporinaze razreda C koje luče različiti gram-negativni bacili mogu pokazivati blagu hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima, njihov učinak nije klinički značajan ako nisu prisutni i drugi mehanizmi rezistencije (najčešće gubitak porina staničnog zida). **CMY-10** (engl. *cephamycinase activity*) do sada je jedina otkrivena β -laktamaza iz ovog razreda koja samostalno dovodi do smanjenja djelotvornosti karbapenema^{73,74}.

Karbapenemaze molekularnog razreda D

Klasične oksacilinaze (npr. OXA-1, OXA-2, OXA-10) razreda D uglavnom posreduju rezistenciju na karboksipeniciline i ureidopeniciline. No neke oksacilinaze (npr. OXA-48-like enzimi) pokazuju slabu, ali značajnu hidrolitičku aktivnost i prema karbapenemima, iako sojevi koji ih luče mogu biti osjetljivi na cefalosporine. Sposobnost oksacilinaza da hidroliziraju karbapeneme mnogo je manja nego MBL, tj. one mogu hidrolizirati imipenem, ali ne uvijek i meropenem. Poput karbapenemaza molekularnog razreda A, oksacilinaze s aktivnošću karbapenemaza obično uzrokuju klinički manifestnu rezistenciju na karbapeneme tek u kombinaciji s drugim mehanizmima rezistencije (gubitak porina vanjske membrane ili efluks). Oksacilinaze razreda D prvenstveno su proširene među nefermentirajućim gram-negativnim bacilima (tablica 2 i tablica 3), rjeđe među enterobakterijama (tablica 1)⁷⁵. Značajne karbapenemaze unutar OXA obitelji koje se javljaju u acinetobaktera su: **OXA-23, OXA-40, OXA-51 i OXA-58** i njihove varijante; **OXA-48** oksacilinaze se javljaju u enterobakterijama, a **OXA-198** je prisutna u pseudomonasu⁷⁶.

Uz MBL molekularnog razreda B, oksacilinaze razreda D smatraju se značajnim mehanizmom rezistencije acinetobaktera na karbapeneme. *A. baumannii* producira prirodenu karbapenemazu OXA-51-like koja nosi smanjenu osjetljivost ili rezistenciju na karbapeneme niskog stupnja jedino ako dođe do pojačane ekspresije zbog genskog preslagivanja. Međutim, acinetobakter na kromosomu ili plazmidima može posjedovati nekoliko filogenetičkih grupa gena za stečene oksacilinaze (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143-like i OXA-235). Nedavnu bolničku epidemiju u Španjolskoj uzrokovao je višestruko rezistentni soj acinetobaktera koji je producirao OXA-23 karbapenemazu⁷⁷. Zabrinjavajući porast otpornosti na karbapeneme zabilježen je posljednjih godina među izolatima acinetobaktera u velikim bolničkim centrima u Hrvatskoj (KBC Split, KBC Zagreb). U našoj su zemlji u kliničkim izolatima acinetobaktera 2009. prvi put opisane OXA-23/27 i OXA-51-like grupe oksacilinaza, a u višestruko otpornim bolničkim izolatima utvrđena je i prisutnost OXA-24 i OXA-58 enzima^{78,79}. Tijekom 2009. u KBC-u Split izoliran je novi klon višestruko otpornog *A. baumannii* koji se proširio iz susjednog BiH, a posjedovao je bla_{OXA-90} i bla_{OXA-72} gene, te gen za VIM karbapenemazu⁸⁰. Novi je klon prisutan i među izolatima acinetobaktera iz kliničkih uzorka pacijenata KBC-a Zagreb⁸¹. Rezultati prošlogodišnjeg istraživanja Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*; ECDC) ukazuju na zabrinjavajuću endemsku prisutnost karbapenem-rezistentnog acinetobaktera u našoj zemlji²⁹.

Nakon prve izolacije OXA-48 karbapenemaze iz *K. pneumoniae* u Turskoj 2001., isti je bakterijski soj uzrokovao više bolničkih epidemija u zemlji^{82,83}, no nakon 2008. soj je pronađen i u drugim mediteranskim zemljama, a gen koji kodira karbapenemazu OXA-48 proširio se i među drugim bakterijama. Danas se Sjeverna Afrika i Srednji Istok smatraju rezervoarom (endemskim područjem) OXA-48 producirajućih sojeva⁸⁴. Iako su u Europi KPC karbapenemaze najrasprostranjenije karbapenemaze među enterobakterijama, prijavljuje se sve veći broj OXA-48-producirajućih izolata enterobakterija, a OXA-48 je postala najučestalija

karbapenemaza u Belgiji, Francuskoj, Malti i Španjolskoj⁸⁵⁻⁸⁷. U RH je 2012. prvi put izolirano šest sojeva enterobakterija koje produciraju OXA-48 β -laktamazu, dok su 2013. prijavljena četiri OXA-48 producirajuća izolata enterobakterija^{27,28}.

ALGORITAM DETEKCIJE KARBAPENEMAZA PRODUCIRAJUĆIH SOJEVA

Zbog raznovrsnosti karbapenemaza i velikog potencijala širenja sojeva koji ih produciraju postoji potreba za brzom i točnom dijagnostikom koja će omogućiti pravovremeni izbor i primjenu odgovarajuće antimikrobne terapije te epidemiološki nadzor nad širenjem sojeva. Odgođeno prepoznavanje i neprimjereno liječenje teških infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima povećava stopu mortaliteta oboljelih^{88,89}. Rano otkrivanje rezistentnih sojeva u kliničkom laboratoriju ključno je u prevenciji bolničkih infekcija. Nažalost, klasične metode dijagnostike zasnovane na kultivaciji traju nekoliko dana, što odgađa primjenu pravovremene terapije i omogućava nekontrolirano širenje bakterije.

Probirni (engl. *screening*) testovi za produkciju karbapenemaza

Detekcija karbapenemaza u laboratoriju započinje nekom od metoda ispitivanja osjetljivosti izoliranih sojeva na karbapeneme temeljenim na kultivaciji (disk-difuzijska metoda, E-test, dilucijske metode, automatizirane metode). Najosjetljivije su metode koje se zasnivaju na određivanju MIK-a pojedinih karbapenema (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem). Do sada su se (kao i u rutinskom određivanju osjetljivosti bakterija na ostale razrede antibiotika) vrijednosti dobivene antibiogramom uspoređivale s tzv. „kliničkim graničnim vrijednostima“ (engl. *clinical breakpoint*) za karbapeneme propisanim odgovarajućim standardima; u Europi je to Standard EUCAST-a (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), te u skladu s tim interpretirala osjetljivost (soj je osjetljiv, umjeren rezistentan ili rezistentan)⁹⁰. Međutim, dijagnostički je problem predstavljala činjenica da sojevi enterobakterija koji luče neku od pet najčešćih karbapenemaza (KPC, OXA-48, IMP, NDM ili VIM) mogu pokazati jako velik raspon osjetli-

vosti. Iako je MIK (dobiven dilucijskom metodom ili E-testom) obično znatno viši od „kliničkih graničnih vrijednosti“ definiranih Standardom (soj je rezistentan u visokom stupnju), ponekad može biti i niži od graničnih vrijednosti (soj je osjetljiv). Naime, enterobakterije koje produciraju karbapenemaze A i B molekularnog razreda mogu imati MIK-ove karbapenema unutar raspona 1 – 4 mg/l (osjetljiv do umjeren rezistentan soj) što može dovesti do pogreške u tumačenju. Da bi se izbjeglo neprepoznavanje sojeva koji produciraju karbapenemaze sa slabijim stupnjem hidrolize, odbor EUCAST-a nedavno je objavio Smjernice za detekciju mehanizama rezistencije⁹¹. U njima su navedene nove tzv. „probirne granične vrijednosti“ (engl. *screening cut-off*) MIK-ova i zona inhibicija za karbapeneme za enterobakterije. „Probirne granične vrijednosti“ MIK-ova nešto su niže, a zona inhibicije nešto više u odnosu na „kliničke granične vrijednosti“. Stoga MIK-ovi ertapenema i meropenema $\geq 0,12$ mg/l, te MIK imipenema ≥ 1 mg/l zahtijevaju dodatna potvrdna testiranja fenotipskim i molekularnim testovima radi potvrde ili isključenja produkcije karbapenemaza. Među svim karbapenemima koji se koriste za testiranje osjetljivosti kliničkih izolata, meropenem pokazuje najbolju osjetljivost i specifičnost za detekciju karbapenemaza producirajućih sojeva. Ertapenem ima odličnu osjetljivost, ali je niske specifičnosti, pogotovo u *Enterobacter* vrsta, zbog relativne nestabilnosti na ESBL i AmpC β -laktamaze ove bakterije u kombinaciji s gubitkom porina. Treba naglasiti da je u Standardu EUCAST-a istaknuta napomena da, ako testirani soj bude kategoriziran kao „osjetljiv“ (na osnovi veličine MIK-a, odnosno zone inhibicije), a dokaže se produkcija karbapenemaza, interpretaciju osjetljivosti nije potrebno naknadno korigirati (isto vrijedi i za interpretaciju osjetljivosti ESBL producirajućih sojeva)⁹⁰. Napominje se da prisustvo ili odsustvo karbapenemaze ne utječe samo po sebi na kategorizaciju osjetljivosti bakterijskog soja, no detekcija karbapenemaza, njihova karakterizacija i prijavljivanje sojeva koji ih proizvode obaveza je kliničkog laboratorija (u nekim zemljama je na razini preporuke) u svrhu kontrole širenja infekcija, kao i zbog epidemioloških razloga. Potrebno je napomenuti da se svi istraživači ne slažu s prepo-

rukama odbora EUCAST da se osjetljivost sojeva koji produciraju karbapenemaze u niskom stupnju interpretira bez dodatne korekcije (engl. *as found*) i tako kliničarima sugerira upotreba karbapenema⁹². Britanski mikrobiološki standard ističe da je prije zauzimanja ovakvog stava potrebno više dokaza o kliničkom uspjehu karbapenema u liječenju infekcija uzrokovanih karbapenemaza producirajućim sojevima s niskim MIK-ovima karbapenema⁹³. Autori ovog standarda preporučuju krajnji oprez prilikom primjene karbapenema kod teških infekcija, kao i izbjegavanje korištenja karbapenema u monoterapiji ako je uzročnik infekcije soj koji producira karbapenemazu, pa čak i u niskom stupnju.

Potvrđni testovi za produkciju karbapenemaza (kombinirani diskovi, modificirani Hodge test)

Nakon uočene smanjene osjetljivosti enterobakterija na karbapeneme potrebno je provesti potvrđna testiranja za produkciju karbapenemaza. Postoji nekoliko mogućih metoda od kojih je novim EUCAST-ovim smjernicama preporučena fenotipska metoda upotrebom kombiniranih diskova (engl. *combination disk test*; CDT). Naime, ova je metoda validirana raznim studijama, tehnički jednostavna za izvođenje (ne zahtijeva posebnu opremu niti dodatnu edukaciju osoblja kao što to iziskuju molekularne metode), a diskovi su komercijalno dostupni (MAST, Velika Britanija; Rosco, Danska)⁹⁴. Diskovi sadrže ili meropenem ili meropenem u kombinaciji s različitim inhibitorima pojedinih enzima. Boronična kiselina selektivno inhibira razred A karbapenemaza, a dipikolonična kiselina ili etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) razred B. Trenutno nema dostupnog inhibitora za oksacilinaze razreda D. Da bi se razlikovala AmpC hiperprodukcija uz gubitak porina od produkcije karbapenemaza, ovim se testovima dodaje i kloksacilin koji inhibira AmpC β-laktamaze. Sinergizam između karbapenema i pojedinog inhibitora definira se kao značajno (> 5 mm) uvećanje zone inhibicije karbapenema ili značajno smanjenje (≥ 8 puta) MIK-a karbapenema u prisutnosti inhibitora (ako se radi o dvostranom E-testu s inhibitorima). Testovi sinergističnog učinka pouzdaniji su u testiranju produkcije karbapenemaza u enterobakterija nego u nefermentirajućih gram-

negativnih štapića. Iako se EDTA/dipikolonična kiselina može primijeniti za detekciju MBL-a u nefermentirajućih gram-negativnih bacila, uočen je visok postotak lažno-pozitivnih rezultata, vjerojatno zbog oštećenja vanjske membrane bakterija ovim kiselinama. Nažalost, nisu dizajnirani komercijalni testovi koji bi omogućili detekciju enterobakterija koje produciraju OXA-48-like enzime. Tako fenotipska detekcija ovih sojeva ostaje problematična. Visok stupanj rezistencije na β-laktamski antibiotik temocilin (MIK > 32 mg/l) može ukazati na prisutnost OXA-48 enzima. Glavni je nedostatak metode kombiniranim diskovima njena sporost (zasniva se na kultivaciji) zbog čega se istražuju novije i brže metode.

Modificirani Hodge test (engl. *Modified Hodge Test*; MHT) preporučili su američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*; CDC) i Institut za laboratorijske standarde (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*; CLSI) za probir karbapenemaza producirajućih sojeva⁹⁵⁻⁹⁷. MHT se zasniva na inaktivaciji karbapenema testiranim sojem ako on producira karbapenemaze, što omogućava karbapenem-osjetljivom indikatorskom soju bakterije da raste uz disk karbapenema. Međutim, EUCAST-ove smjernice ne preporučuju MHT zbog mogućih poteškoća pri interpretaciji rezultata, niske specifičnosti, a u nekim slučajevima i osjetljivosti (npr. slaba detekcija MBL)⁹⁸. Ipak, prednost je MHT-a u tome što može s visokim stupnjem osjetljivosti osigurati detekciju bakterija koje proizvode OXA-48-like enzim⁹⁴.

Selektivna hranilišta

Selektivna se hranilišta sve više koriste za probir bakterija koje produciraju karbapenemaze u kliconoša iz nadzornih uzoraka kao što su stolica i obrisak rektuma. Iako nema idealnog hranilišta, tj. *zlatnog standarda*, na tržištu je dostupan velik izbor različitih hranjivih podloga. Selektivna hranilišta koja se koriste za tu svrhu moraju sadržavati inhibitore rasta popratne mikrobiote i biokemijske indikatore za diferencijaciju grupe/vrste (kromogeni supstrat ili fermentabilni ugljikohidrat s pH indikatorom). Hranilišta koja sadrže imipenem koriste se za probir KPC sojeva. Kromogeni CHROMagar KPC (HyLabs, Rehovot, Izrael)

pokazao je visoku osjetljivost i specifičnost u detekciji rezistentnih sojeva izravno iz kliničkih uzoraka⁹⁹. Nažalost ovo selektivno hranilište nije pogodno za detekciju OXA-48-like sojeva. Nedavno je patentirano novo selektivno hranilište (Super-Carba) kojim se mogu detektirati svi razredi karbapenemaza producirajućih sojeva bakterija, uključujući i OXA-48¹⁰⁰.

Biokemijska identifikacija karbapenemaza zasnovana na hidrolizi karbapenema (Carba NP test, UV spektrofotometrija, MALDI-TOF)

Carba NP test (engl. *Carbapenemase Nordmann-Poirel*) je kolorimetrijski test zasnovan na hidrolizi karbapenema od karbapenemaza producirajućeg soja te posljedično produkciji kiseline, padu pH i promjeni boje indikatora¹⁰¹. Iako zahtijeva prethodnu inkubaciju mikroorganizma s karbapenemom test može biti gotov unutar dva sata. Ako se testira i hidroliza karbapenema uz prisutnost različitih inhibitora β-laktamaza test se može koristiti i za svrstavanje detektirane karbapenemaze u odgovarajući razred (A, B ili D). Istraživači koji su osmislili Carba NP test ističu da test ima visoku osjetljivost i specifičnost, te da se može koristiti za detekciju karbapenemaza u enterobakterija i u pseudomonasa. Prednost je ovog testa u odnosu na molekularne tehnike u tome što se njime mogu detektirati ne samo poznate, već i novo izolirane karbapenemaze¹⁰². Dodatne prednosti ove metode svakako su brzina izvođenja i cijena. Ipak, test treba dodatnu validaciju da bi se odredila njegova osjetljivost i specifičnost. Prije korištenja u rutinskom radu potrebno je testirati sve tipove karbapenemaza te utvrditi specifičnost testa testiranjem sojeva koji produciraju veće količine AmpC enzima.

UV spektrofotometrijskim testom mjeri se hidroliza karbapenema spektrofotometrom, uređajem koji je dostupan u većini mikrobioloških laboratorija¹⁰³. Test se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju hidrolize imipenema u proteinskom ekstraktu bakterijske kulture. Metoda je jeftina i ima visoku osjetljivost i specifičnost za detekciju bilo koje karbapenemaze. Nedostatak metode je vrijeme potrebno za njeno izvođenje.

Odnedavno se i masena spektrofotometrija počela koristiti za detekciju aktivnosti karbapenemaza. **MALDI-TOF masena spektrometrija** (engl. *ma-*

trix-assisted laser desorption ionization time of flight) već se neko vrijeme koristi u mikrobiološkim laboratorijima u svrhu identifikacije bakterija. Metoda je našla primjenu u detekciji karbapenemaza, budući da je njome moguće detektirati hidrolizirane fragmente karbapenema¹⁰⁴. Test još uvijek nije komercijalno dostupan te zahtijeva prethodnu inkubaciju karbapenema s testiranim mikroorganizmom, ali može biti gotov u manje od dva sata. Ipak je, prije korištenja u dijagnostičke svrhe, potrebno validirati osjetljivost i specifičnost testa. Iako je metoda brza, zahtjev za educiranim osobljem i visoka cijena uređaja čine metodu, barem u nas, pogodnom jedino za referentne laboratorije. Iako su konvencionalne fenotipske metode spore, prošle su opsežniju evaluaciju te su s obzirom na to bolji izbor za rutinske laboratorije bez posebnog iskustva u detekciji β-laktamaza.

Molekularne metode (PCR, DNK čipovi)

Najpouzdanija metoda detekcije karbapenemaza je amplifikacija gena koji ih kodiraju **lančanom reakcijom polimeraze** (engl. *polymerase chain reaction*; PCR). Noviji RT-PCR testovi (engl. *real-time*) mogu detektirati gene rezistencije pojedinih karbapenemaza izravno iz kliničkih uzoraka u par sati¹⁰⁵. Za razliku od konvencionalne PCR metode, **multipleks PCR metoda** omogućava istovremeno određivanje većeg broja najčešćih gena za karbapenemaze iz različitih razreda (npr. *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} itd.), što znatno ubrzava postupak^{106,107}. Budući da karbapenemaze mogu biti kodirane različitim genima, potreban je visoko složen multipleks PCR test za detekciju svih sekvencija. Multipleks PCR metode zbog svoje složenosti često prije same uspostave zahtijevaju uz validaciju i opsežnu optimizaciju. Nedavna je studija potvrdila pouzdanost, visoku osjetljivost i specifičnost jedne RT-multipleks PCR metode¹⁰⁸. Suvremena se molekularna epidemiologija u određivanju klonske pripadnosti i genske raznolikosti izolata oslanja na genotipske metode zasnovane na hibridizaciji, detekciji fragmenata ili sekvenciranju. Neke od češće korištenih metoda su: gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*; PFGE), metoda nasumično umnoženog polimorfnog DNK-a (engl.

random amplification of polymorphic DNA; RAPD), sekvenciranje jednog lokusa (engl. *single locus sequence typing*; SLST), sekvenciranje više genskih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*; MLST) itd.^{109,110}

Odnedavno su komercijalno dostupni i **DNK čipovi** (engl. *DNA microarray test*) za detekciju većeg broja transkripata najčešćih karbapenemaza (NDM, VIM, KPC, OXA-48, IMP tipa) istovremeno. DNK čip tehnologijom moguće je detektirati karbapenemaze u vrlo kratkom vremenu izravno u kliničkom materijalu, uz visoku osjetljivost i specifičnost^{111,112}. Metoda se zasniva na hibridizaciji nukleinskih kiselina vezanih na nosaču kao što je staklena podloga. Nedostatak molekularnih metoda za detekciju karbapenemaza je njihova cijena, zahtjev za obučanim osobljem i tehničkom opremom, te nemogućnost dokazivanja novih gena. Mali broj rutinskih laboratorija u Hrvatskoj raspolaže molekularnim metodama, pa su one ograničene na istraživačke i referentne centre.

PREVENCIJA I LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH KARBAPENEMAZA PRODUCIRAJUĆIM SOJEVIMA

Prevenција infekcija

Širenje karbapenemaza među gram-negativnim bakterijama pokazuje povećan trend u čitavom svijetu. Iz godine u godinu povećava se broj znanstvenih publikacija na temu bakterija koje produciraju karbapenemaze i infekcija uzrokovanih ovim sojevima što ukazuje na njihov sve veći javnozdravstveni značaj. Tablica 4 prikazuje rezultate dobivene pretraživanjem bibliografske baze MEDLINE/PubMed s ključnom riječju "karbapenemaze" (uključeni izvorni znanstveni članci i prikazi kliničkih slučajeva) u periodu od 2000. do 2013. Karbapenemaza producirajuće enterobakterije (engl. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*; CPE) i nefermentirajući gram-negativni bacili mogu uzrokovati razne vrste bolničkih infekcija, uglavnom vezane uz intenzivnu skrb i invazivno liječenje (sepsa, infekcija kirurške rane, infekcija mokraćnog sustava, upala pluća vezana uz primjenu respiratora). No, osobe mogu biti i kolonizirane rezistentnim sojem bez znakova oboljenja. Svaki pozitivan nalaz ne znači uvijek da se radi o infekciji i ne zahtijeva nužno liječenje an-

Tablica 4. Rezultati pretraživanja bibliografske baze MEDLINE/PubMed ključnom riječju "karbapenemaze"

Godina	Broj publikacija*
2013.	342
2012.	289
2011.	220
2010.	148
2005.	24
2000.	13

*uključeni izvorni znanstveni članci i prikazi kliničkih slučajeva (izuzeti pregledni članci)

tibioticima, ali zahtijeva primjenu mjera sprječavanja širenja uzročnika na druge pacijente. Rizični faktori za stjecanje CPE-a isti su kao za većinu bolničkih infekcija uzrokovanih drugim patogenima kao što su meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin rezistentni enterokok, *Clostridium difficile* i sl. Istraživanja su pokazala da postoje brojni faktori rizika za stjecanje kliconoštva na CPE: težina bolesti, dužina hospitalizacije ili smještaj u jedinici intenzivnog liječenja (JIL), prethodna antimikrobna terapija i imunosupresija, umjetna ventilacija i dr. Strana tijela (kateteri, drenovi i sl.) također povećavaju rizik od kolonizacije i infekcije. Premještaj pacijenata iz endemskih područja također se smatra faktorom rizika za stjecanje CPE-a¹¹³. Sve je veći broj informacija da ustanove za dugotrajno liječenje imaju važnu ulogu u širenju CPE-a. Premještaj pacijenata iz ovih u druge bolničke ustanove povezuje se s porastom rezistencije na karbapeneme u pacijenata inficiranih enterobakterijama¹¹⁴. Karbapenemaza producirajuće bakterije prenose se kontaktom (dodirom) rukama – izravno ili neizravno (preko kontaminiranih predmeta), a sprječavanje širenja bolničkih infekcija zasniva se na ranom otkrivanju koloniziranih osoba. U probir potencijalnih kliconoša svakako treba uvrstiti rizične pacijente smještene u JIL-u, transplantirane, imunokompromitirane i pacijente premještene iz ustanova s povećanim rizikom od kliconoštva. Budući da je probavni sustav rezervoar enterobakterija, najbolji klinički uzorci za probir na kliconoštvo su stolica ili bris rektuma.

Iako nema točnih podataka o proširenosti sojeva rezistentnih na karbapeneme u bolničkim i izvan-

bolničkim zdravstvenim ustanovama u Europi, publikacije ekspertnih grupa i službi za praćenje, uključujući EARS-Net (engl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*; ECDC), ukazuju na znatnu proširenost gram-negativnih bakterija rezistentnih na karbapeneme u nekim europskim zemljama¹¹⁵. U sklopu programa ECDC "Karbapenemaza producirajuće bakterije u Europi" 2013. je pokrenut projekt EuSCAPE

Pojava i širenje karbapenemaza producirajućih enterobakterija, pseudomonasa i acinetobaktera značajno pridonosi povećanom pobolu i smrtnosti pacijenata. Zbog suženih terapijskih mogućnosti, u borbi protiv infekcija koje uzrokuju ovi sojevi od presudne su važnosti: racionalna primjena antibiotika, pravovremena dijagnostika, primjena novih kombinacija postojećih antibiotika i dosljedno provođenje mjera za sprječavanje bolničkih infekcija.

(engl. *European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) koji se bavi prikupljanjem podataka iz 39 europskih zemalja o prisutnosti, vrstama i proširenosti CPE-a te acinetobaktera rezistentnog na karbapeneme (engl. *carbapenem-resistant acinetobacter*; CRA)^{29,116}. Cilj projekta je ažuriranje podataka o rezistenciji, kao i podrška referentnim nacionalnim laboratorijima u prevenciji širenja ovih sojeva. Rezultati istraživanja provedenog tijekom veljače i ožujka 2013. pokazuju da se CPE i CRA kontinuirano šire Europom, uz zabrinjavajuće pogoršanje epidemiološke situacije tijekom posljednjih triju godina. Ustanovljeno je da dio sudjelujućih zemalja nema nacionalne smjernice za kontrolu infekcija CPE-om, a svega dvije zemlje posjeduju smjernice za kontrolu infekcija uzrokovanih CRA-om.

Prava proširenost sojeva koji produciraju karbapenemaze u čitavom svijetu nije u potpunosti poznata zbog toga što mnoge zemlje koje su mogući glavni rezervoar (endemska područja) nemaju organizirano sustavno praćenje rezistencije i odgovarajuće protokole za laboratorijsku detekciju rezistentnih sojeva. Radi sprječavanja širenja infekcija uzrokovanih ovim sojevima u bolnicama

i drugim ustanovama za njegu pacijenata (rehabilitacijski centri, hospiciji i sl.) američki CDC je 2009. izdao Smjernice za kontrolu širenja enterobakterija rezistentnih na karbapeneme (engl. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*; CRE) i CPE sojeva^{117,118}. U Smjernicama ECDC-a iz 2011. ističe se da su mjere za sprječavanje širenja CPE-a slične mjerama koje se poduzimaju za druge višestruko otporne bakterije¹¹⁹. Standardizirano praćenje rezistencije na antimikrobne lijekove, pa tako i na karbapeneme, na razini Europe započelo je 1999. kroz projekt EARSS u koji se uključila i naša zemlja. U Hrvatskoj se, u sklopu nacionalnog praćenja rezistencije, već duže od deset godina sustavno prati rezistencija na karbapeneme. Svi izolati enterobakterija sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme šalju se u Referentni centar Ministarstva zdravlja RH za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Kliniku za infektivne bolesti Zagreb gdje se tipiziraju. Genotipizacijom sojeva utvrđuje se radi li se o jednom klonu koji se zbog nedovoljnog pridržavanja mjera kontrole i širenja infekcije proširio unutar zdravstvene ustanove ili se radi o poliklonskoj rezistenciji zbog selekcijskog pritiska antibiotika u upotrebi. U epidemiološkim je istraživanjima diferencijacija sojeva od ključne važnosti za prekid epidemijaskog procesa jer omogućava međusobno povezivanje kliničkih slučajeva s epidemijama, rezervoarima i putovima prenošenja bakterija.

Zajedničkim djelovanjem dvaju povjerenstava unutar Ministarstva zdravlja – Interdisciplinarnе sekcije za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA) i Povjerenstva za prevenciju i kontrolu bolničkih infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi, 2012. godine donesen je nacionalni Naputak za kontrolu širenja KPC sojeva¹²⁰. U Naputku je između ostalog istaknuto da su osnovne mjere sprječavanja širenja sojeva u bolnici: higijena ruku, nošenje zaštitnih pregača i rukavica za osoblje u neposrednom kontaktu s pacijentom, zasebno osoblje koje brine o pacijentima te smještaj pacijenata u zasebnoj sobi sa zasebnim sanitarnim čvorom ili kohortiranje pacijenata. Pri otpustu pacijenata potrebno je uzeti nadzorne uzorke za mikrobiološku obradu (stolica, bris rektuma) na KPC *K. pneumoniae*. U otpusnom pismu treba naglasiti da je osoba kliconoša. Čim se po-

tvrdi da se radi o karbapenemaza producirajućem soju potrebno je izvjestiti tim za kontrolu bolničkih infekcija te predstojnika odjela na kojem je smješten pacijent radi promptnog provođenja mjera sprječavanja širenja infekcije. Također je u mikrobiološkom nalazu potrebno istaknuti da se radi o rezistentnom soju te da je potrebno primijeniti mjere kontaktne izolacije na odjelu na kojem se pacijent liječi. Naime, budući da je razvoj antibiotika kojima bi se liječile infekcije uzrokovane karbapenemaza producirajućim sojevima ograničen, rana detekcija i sprječavanje širenja infekcija kroz pravodobno poduzimanje mjera kontrole infekcija bolja je opcija nego liječenje. U eradikaciji kliconoštva (kolonizacija crijeva) karbapenemaza producirajućih sojeva pokazala se djelotvorna oralna primjena neapsorbirajućih antibiotika na koje su sojevi osjetljivi (gentamicin, kolistin ili oba antibiotika zajedno)^{121,122}. Navedeno bi se moglo koristiti u sprječavanju razvoja infekcija u osjetljivih koloniziranih pacijenata (transplantirani, odnosno imunološki suprimirani pacijenti), ali i u svrhu sprječavanja prijenosa bakterija s pacijenta na pacijenta i ukupnog smanjenja incidencije infekcija CPE-om u zdravstvenim ustanovama.

Antimikrobno liječenje infekcija uzrokovanih karbapenemaza producirajućim sojevima

Infekcije koje uzrokuju gram-negativni karbapenemaza producirajući bacili imaju visoku stopu mortaliteta zbog čega se ove bakterije u medijima često nazivaju „superbakterije“. Kliničari koji liječe infekcije uzrokovane ovim sojevima susreću se s brojnim poteškoćama: vrlo sužen izbor djelotvornih antibiotika, manjak kliničkih podataka o djelotvornosti pojedinih antibiotika, rizik od mogućeg toksičnog učinka i dr. Izbor antimikrobne terapije često je ograničen na polimiksine i tigecklin, antibiotike koji imaju određena ograničenja. **Polimiksini** (kolistin, polimiksin B) pokazuju *in vitro* djelotvornost protiv većine karbapenemaza producirajućih sojeva, s iznimkom prirođeno otpornih vrsta, kao što su *Morganella*, *Providencia*, *Proteus* i *Serratia*. No klinička učinkovitost polimiksina u liječenju osjetljivih sojeva nepredvidiva je, naročito u liječenju pneumonija zbog slabog prodora lijeka u tkivo pluća i različitih nuspojava.

Najteža nuspojava je nefrotoksičnost koja se javlja u 10 – 15 % slučajeva i u većini je slučajeva prolazna. U prošlosti je upotreba polimiksina bila ograničena, a kolistin se koristio češće od polimiksina B, no pojava višestruko rezistentnih sojeva obnovila je interes za vraćanje polimiksina u kliničku upotrebu. Novija su istraživanja upotpunila saznanja o farmakokinetici i farmakodinamici kolistina, a poboljšanje farmakoloških osobina lijeka i prilagodba doza koja se danas primjenjuje u terapiji povećala je djelotvornost i učinila antibiotik sigurnijim za primjenu¹²³. Novije studije sugeriraju primjenu visoke inicijalne doze kolistina kojom se brzo postiže aktivna terapijska koncentracija lijeka na mjestu infekcije^{124,125}. *In vitro* osjetljivost kliničkih izolata KPC producirajućih bakterija na kolistin je između 90 i 100 %, a kolistin je često jedini učinkoviti antibiotik koji postiže dovoljne serumske razine za liječenje infekcija krvožilnog sustava¹²⁶. Rezistencija na kolistin razvija se brže u *K. pneumoniae* nego u *A. baumannii* ili *P. aeruginosa*¹²⁷.

Tigeciklin je gliciciklin, polusintetski analog tetraciklina s bakteriostatskim učinkom protiv širokog spektra bakterija, uključujući višestruko otporne mikroorganizme, no bez učinka na *P. aeruginosa*¹²⁸. Iako pokazuje *in vitro* djelotvornost protiv CRE-a, budući da se izlučuje putem žuči, tigeciklin nije pogodan za liječenje infekcija mokraćnog sustava. Postiže niske serumske razine, a njegova učinkovitost u liječenju bakterijemija i drugih teških infekcija nije dokazana¹²⁹. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) ne preporučuje ga za liječenje teških infekcija kao što su pneumonije u pacijenata na umjetnoj ventilaciji¹³⁰. Grupa autora je u retrospektivnoj studiji prikazala visoku učinkovitost tigeciklina u liječenju CPE i CRA infekcija različitih sustava, naročito intraabdominalnih i kožnih infekcija¹³¹. Na žalost, utvrđeno je da tijekom liječenja CPE infekcija kao što su pneumonije i urosepse brzo može doći do razvoja rezistencije^{132,133}. Rezistencija na **aminoglikozide** među CPE izolatima je u porastu, no ako je uzročnik osjetljiv na aminoglikozide oni su dobar izbor za liječenje, ali u kombinaciji s drugim djelotvornim antibiotikom. **Nitrofurantoin** i **fosfomicin** pokazuju učinkovitost u liječenju infekcija mokraćnog sustava

uzrokovanih osjetljivim karbapenemaza producirajućim sojevima, ali nisu pogodni za ascendirajuće infekcije¹³⁴. Stavovi oko uporabe **karbapenema** u liječenju infekcija uzrokovanih karbapenemaza producirajućim bakterijama su kontradiktorni, no rezultati grupe istraživača ukazuju na njihovu učinkovitost u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko otpornim karbapenemaza producirajućim sojevima pseudomonasa^{93,135}. Autori naglašavaju da je neophodno primijeniti visoke koncentracije antibiotika s ciljem da serumske razine budu najmanje četiri puta više od MIK-a.

Zbog nedostatka randomiziranih kontroliranih studija o ishodu liječenja infekcija uzrokovanih CPE-om, postojeće se preporuke za liječenje uglavnom temelje na analizama dokaza iz pojedinih znanstvenih članaka, odnosno iskustvu kliničara. Potrebno je naglasiti da su podaci o antimikrobnoj osjetljivosti uzročnika i lokacija infekcije od ključnog značaja za izbor odgovarajuće antimikrobne terapije. Međunarodna radna skupina sastavljena od kliničkih mikrobiologa, infektologa, farmakologa i drugih stručnjaka objavila je 2013. Preporuke za detekciju, liječenje i prevenciju CPE-a¹²⁵. Ove preporuke temelje se na opsežnom pretraživanju relevantnih elektroničkih baza podataka kao što je MEDLINE, te analizi studija o načinu i ishodu liječenja pacijenata inficiranih CPE-om. Analiza prospektivnih kohortnih, anamnestičkih i drugih deskriptivnih studija pokazala je da je **kombinirana primjena dvaju djelotvornih antibiotika** učinkovitija nego monoterapija. Kombinacija karbapenema s drugim aktivnim lijekom, po mogućnosti aminoglikozidom ili kolistinom pokazala se učinkovita u sojeva s nižim MIK-ovima na karbapeneme (≤ 4 mg/l) i ako su primijenjene veće doze karbapenema u trajnoj infuziji. Ako nije poznat podatak o MIK-u karbapenema ili je on veći od 8 mg/l, korištenje karbapenema u kombiniranoj terapiji nije opravdano i ne preporučuje se. Prednost kombinirane terapije pokazana je i preglednim prikazom podataka dobivenih sustavnim pretraživanjem ishoda liječenja pacijenata s KPC infekcijama. Pretraživanjem radova objavljenih u bazi podataka MEDLINE u periodu od 2001. do 2011. utvrđeno je da su podjednako djelotvorne kombinacije kolistina s aminoglikozidom, tigeciklinom ili karbapenemom¹³⁶. Još je

jednim opsežnim pregledom i analizom objavljenih rezultata liječenja KPC infekcija ustanovljena veća djelotvornost kombiniranog liječenja kolistinom i drugim djelotvornim antibiotikom u usporedbi s monoterapijom kolistinom¹³⁷.

Razumijevanje mehanizama rezistencije bakterija na antibiotike i razvoj novih lijekova koji mogu zaobići ove mehanizme čine osnovu istraživanja antibiotika. Liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama koje luče karbapenemaze predstavlja jedan od izazova koje tek treba nadići. U eri antimikrobne rezistencije postaje neophodan razvoj antimikrobnih agensa kao što su **novi inhibitori β -laktamaza**. Četiri razreda Amblerovih β -laktamaza imaju bitno drugačiji katalitički mehanizam djelovanja, te je pronalaženje učinkovitih omnipotentnih inhibitora težak zadatak. Naime, kombinacije β -laktama s klasičnim inhibitorima β -laktamaza koje su već dugo u upotrebi (npr. klavulanska kiselina) djelotvorne su samo protiv β -laktamaza razreda A i različitih ESBL enzima, ali imaju vrlo slab učinak protiv β -laktamaza C i D razreda. Nekoliko se novih inhibitora β -laktamaza nalazi u različitim fazama pretkliničkih i kliničkih studija¹³⁸. Ohrabruju rezultati istraživanja primjene karbapenema u kombinaciji s novim inhibitorima koji tako postaju djelotvorni protiv MBL-producirajućih sojeva¹³⁹. Mnogi od antibiotika koji se testiraju u kombinaciji s nekim od novih inhibitora već su dugi niz godina u upotrebi. U fazi III kliničkog ispitivanja nalazi se **kombinacija ceftazidima, odnosno ceftarolina s avibaktamom** (novi ne β -laktamski inhibitor β -laktamaza) za liječenje kompliciranih intraabdominalnih infekcija i kompliciranih infekcija mokraćnog sustava, te **imipenema s inhibitorom MK-7655**. U preglednom radu autori daju opsežan prikaz kemijske građe, antimikrobnog djelovanja i farmakodinamike novih inhibitora karbapenemaza (avibaktam, MK-7655, ME1071 itd.) koji se nalaze u različitim fazama istraživanja¹⁴⁰.

ZAKLJUČAK

Široka upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini znatno je ubrzala selekciju otpornih sojeva bakterija. Primjena karbapenema u liječenju infekcija uzrokovanih otpornim sojevima dovela je do pojave karbapenemaza producirajućih sojeva gram-negativnih bakterija otpornih na

više skupina, pa čak i na sve postojeće antibiotike. Zbog suženih terapijskih mogućnosti pred istraživače se danas postavlja ozbiljan zadatak pronalazjenje antibiotika koji bi imali novi mehanizam djelovanja, te bili djelotvorni protiv višestruko otpornih sojeva. Razvoj antibiotika dugotrajan je proces, a do pronalaska novih djelotvornih antimikrobnih lijekova neophodno je sačuvati djelotvornost antibiotika koji su u kliničkoj upotrebi. Razumna primjena karbapenema smanjit će selekciju otpornih sojeva i osigurati daljnju primjenu ovih β -laktama širokog spektra, bilo samih ili u kombinaciji s drugim antibioticima. Liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim mikroorganizmima zahtijeva suradnju stručnjaka iz različitih disciplina, uključujući epidemiologe, infektologe, kliničke mikrobiologe, kliničke farmakologe i dr. Posebnu pozornost treba pokloniti prevenciji tj. sprječavanju širenja otpornih sojeva provođenjem naputaka i smjernica koje su izdala mjerodavna nacionalna tijela i bolnička povjerenstva, s naglaskom na ranu i točnu dijagnostiku i pravovremenu izolaciju kliconoše/oboljelog.

ZAHVALE

Rad je izrađen u okviru projekta *Molekularni mehanizmi bakterijske patogeneze i odgovora na stres* (br. 13.06.1.1.07.) koji je financiralo Sveučilište u Rijeci; voditelj projekta je prof. dr. sc. Maja Abram.

Izjava o sukobu interesa: autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1–17.
2. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4943–60.
3. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas M. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939–46.
4. Yigit H, Queenan A, Anderson G, Domenech-Sanchez A, Biddle J, Steward C et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151–61.
5. Patel G, Bonomo R. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:555–70.
6. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Al E. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
7. Mathers A, Cox H, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga A, Carroll J et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals inter-genus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio* 2011;2:204–11.
8. Ambler R. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* 1980;289:321–31.
9. Hall B, Barlow M. Revised Ambler classification of lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:1050–1.
10. Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211–33.
11. Poirel L, Weldhagen G, Naas T, De Champs C, Dove M, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2598–603.
12. Villegas M, Lolans K, Correa A, Kattan J, Lopez J, Quinn J. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1553–5.
13. Moubareck C, Brémont S, Conroy M, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3579–81.
14. Robledo I, Aquino E, Santé M, Santana J, Otero D, León, CF VG. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1354–7.
15. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore D, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262–70.
16. Yang Y, Wu P, Livermore D. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:755–8.
17. Troillet N, Carmeli Y, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M. Epidemiological analysis of imipenem-resistant *Serratia marcescens* in hospitalized patients. *J Hosp Infect* 1999;42:37–43.
18. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165:1430–5.
19. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228–3.
20. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber M, Rasheed J, Srinivasan A, Patel J. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:818–20.
21. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review

- of the current evidence. *Euro Surveill* [Internet]. 2008;13. [cited 2014 Mar 1] Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8023>.
22. Tzouveleki L, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios P, Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682–707.
 23. Chen L, Mediavilla J, Endimiani A, Rosenthal M, Zhao Y, Bonomo R et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla* KPC) variants. *J Clin Microbiol* 2011;49:579–85.
 24. Smith Moland E, Hanson N, Herrera V, Black J, Lockhart T, Hossain A et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:711–4.
 25. Woodford N, Tierno PJ, Young K, Tysall L, Palepou M, Ward E et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4793–9.
 26. Bedenic B, Mazzariol A, Plecko V, Bosnjak Z, Barl P, Vranes J et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 2012;24:237–9.
 27. Butić I, Tambić Andrašević A. Testiranje izolata posebnog značaja. In: Tambić Andrašević A, Tambić T (eds). *Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2012. g.* Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2013;125–7.
 28. Butić I. Izvještaj o pojavi i kretanju karbapenem rezistentnih enterobakterija u Hrvatskoj. In: Tambić Andrašević A (eds). *Zapisnik sa sastanka odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH.* Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2013.
 29. European Centre for Disease Prevention and Control [Internet]. Stockholm: ECDC. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. EuSCAPE project. c2013 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>
 30. Rasmussen B, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C et al. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2080–6.
 31. Pottumarthy S, Moland E, Juretschko S, Swanzy S, Thomson K, Fritsche T. *NmcA* carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9:999–1002.
 32. Aubron C, Poirel L, Ash R, Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005;11:260–4.
 33. Bejuk D, Novkoski M, Juranko V, Prajdić-Predrijevac D, Todorčić N, Mikačić I et al. Prikaz rijetko viđenog oblika otpornosti na karbapeneme u vrste *Enterobacter cloacae*. *Liječ Vjesnik* 2013;135:316–21.
 34. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron *In52* from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622–32.
 35. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, De-laire T et al. GES extended-spectrum- β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4872–8.
 36. Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra M, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2321–4.
 37. Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:755–8.
 38. Yong D, Toleman M, Giske C, Cho H, Sundman K, Lee K et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046–54.
 39. Kumarasamy K, Toleman M, Walsh T, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10:597–602.
 40. Rolain J, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *CMI* 2010;16:1699–701.
 41. Hasan B, Perveen K, Olsen B, Zahra R. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Pakistan. *J Med Microbiol* 2014;63:50–5.
 42. Jovčić B, Lepšanić Z, Suljagić V, Rackov G, Begović J, Topisirović L et al. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3929–31.
 43. Pittalis S, Ferraro F, Puro V. NDM-1: the superbug? *Infez Med* 2011;19:224–34.
 44. Walsh T, Weeks J, Livermore D, Toleman M. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:355–62.
 45. Perry J, Naqvi S, Mirza I, Alizai S, Hussain A, Ghirardi S et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2288–94.
 46. Struelens M, Monnet D, Magiorakos A, Santos O’Connor F, Giesecke J. European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill* [Internet] 2010;15. [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19716>.
 47. Mazzariol A, Bosnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenic B, Kalenic S et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2012;18:532–4.
 48. Tambić Andrašević A, Jelić M, Gužvinec M, Butić I, Bukovski S. Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. *Infektol Glas* 2012;32:45–52.
 49. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147–51.

50. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:349–53.
51. Pollini S, Fiscarelli E, Mugnaioli C, Di Pilato V, Ricciotti G, Neri A et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo- β -lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1272–5.
52. Milan O, Debroize L, Bertrand X, Plesiat P, Valentin A, Quentin R et al. Difficult-to-detect carbapenem-resistant IMP13-producing *P. aeruginosa*: experience feedback concerning a cluster of urinary tract infections at a surgical clinic in France. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2013;2. [cited 2014 Mar 1] Available from: <http://www.aricjournal.com/content/2/1/12>.
53. Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo F, Artiles F, Alamo I et al. First detection in Europe of the metallo- β -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:424–7.
54. Deshpande L, Davies T, Blandino G, Nicoletti G, Jones R, Castanheira M. MP-33, a New IMP variant detected in *Pseudomonas aeruginosa* from Sicily. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:6401–3.
55. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4427–32.
56. Lauretti L, Riccio M, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584–90.
57. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini G, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000;31:1119–25.
58. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321–31.
59. Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED et al. Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a University hospital. *J Clin Microbiol* 2013;51:665–8.
60. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891–7.
61. Sardelic S, Pallecchi L, Punda-Polic V, Rossolini G. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo- β -lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1022–3.
62. Sardelic S, Bedenic B, Colinson-Dupuich C, Orhanovic S, Bosnjak Z, Plecko V et al. Infrequent finding of metallo- β -lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2746–9.
63. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouveleki L. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395–7.
64. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
65. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791–8.
66. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, bla-IMP-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6154–9.
67. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4194–7.
68. Poirel L, Rodríguez-Martínez J, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp Y, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2420–4.
69. Wachino J, Yoshida H, Yamane K, Suzuki S, Matsui M, Yamagishi T et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5143–9.
70. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier J et al. FIM-1, a New Acquired Metallo-beta-Lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:410–6.
71. Mohamed N, Raafat D. Phenotypic and genotypic detection of metallo- β -lactamases in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Alexandria, Egypt. *Res J Microbiol* 2011;6:750–60.
72. Peleg A, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538–82.
73. Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
74. Poirel L, Pitout J, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Futur Microbiol* 2007;2:501–12.
75. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:373–83.
76. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4828–33.
77. Merino M, Poza M, Roca I, Barba M, Sousa M, Vila J et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist* 2013; Forthcoming.
78. Goic-Barisic I, Bedenic B, Tonkic M, Novak A, Katic S, Kalenic S et al. Occurrence of OXA-107 and ISAba1 in carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Croatia. *J Clin Microbiol* 2009;47:3348–9.

79. Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Kalenić S. Multiplo rezistentni *Acinetobacter baumannii* u sjeverozapadnoj Hrvatskoj i Istri. *In: Tambić Andrašević A, Tambić T (eds). Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2012.g.* Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2013;156.
80. Goić Barišić I. *Acinetobacter baumannii*: jesmo li izgubili trku s multiplorezistentnom bakterijom. *In: Tambić Andrašević A, Payerl-Pal M (eds). VII. Hrvatski simpozij o rezistenciji bakterija na antibiotike: Zbornik radova; 2012 Apr 27–28; Zagreb. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2012;31–32.*
81. Goić-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A, Sisko-Kraljevic K, Tonkic M, Novak A et al. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hosp Infect* 2011;77:368–9.
82. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15–22.
83. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2950–4.
84. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemase: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597–606.
85. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2420–3.
86. Glupczynski Y, Huang T, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gerard M et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:168–72.
87. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernandez-Romero S, Hernandez-Molina J, Perez-Vazquez M et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:6344–7.
88. Patel G, Huprikar S, Factor S, Jenkins S, Calfee D. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29: 1099–106.
89. Gasink L, Edelstein P, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman N. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:1180–5.
90. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Sweden: EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (v 4.0), c2014 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.eucast.org>.
91. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Sweden: EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (v 1.0) c2013 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.eucast.org>.
92. Livermore D, Andrews J, Hawkey P, Ho P, Keness Y, Doi Y et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1569–77.
93. Health Protection Agency [Internet]. London: HPA. UK Standards for microbiology investigations. Laboratory detection and reporting of bacteria with carbapenem-hydrolysing- β -lactamases (carbapenemases). c2013 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.hpa.org.uk>.
94. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church D, Pitout J. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that reduce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012;50: 3877–80.
95. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Atlanta: CDC. Department of health and human services. Modified Hodge test for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*. c2013 [cited 2014 Mar 1]. Available from: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/hodgetest_carbapenemase_enterobacteriaceae.pdf.
96. Clinical Laboratory Standards Institute [Internet]. Wayne: CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement M100–S22. c2012 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://clsi.org/>.
97. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Atlanta: CDC. Department of health and human services. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs. c2009 [cited 2014 Mar 1]. Available from: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf.
98. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012;50:477–9.
99. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2011;49:2239–42.
100. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:214–7.
101. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012;18: 1503–7.
102. Dortet L, Brécharde L, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Strategy for a rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; Forthcoming.
103. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74: 88–90.
104. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez J, Miranda-Casas C, Rojo-Martín M, Liebana-Martos C, Navarro-Marí J. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol* 2013; Forthcoming.
105. Richter SN, Frasson I, Biasolo MA, Bartolini A, Cavallaro A, Palù G. Ultrarapid detection of blaKPC1/2-12 from perirectal and nasal swabs by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2012;50:1718–20.

106. Poirel L, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119–23.
107. Monteiro J, Widen R, Pignatari A, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:906–9.
108. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis* 2014; Forthcoming.
109. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Bojarska K et al. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5493–9.
110. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:487–9.
111. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol* 2012;61:809–12.
112. Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K et al. Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *J Clin Microbiol* 2012;50:3990–8.
113. Ben-David D, Masarwa S, Navon-Venezia S, Mishali H, Fridental I, Rubinovitch B et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:845–53.
114. Hyle E, Ferraro M, Silver M, Lee H, Hooper D. Ertapenem-resistant Enterobacteriaceae: risk factors for acquisition and outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1242–9.
115. Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net) [Internet]. Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). c2005 – 14 [cited 2014 Mar 1] Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database.
116. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* [Internet]. 2013;18. [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20525>.
117. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:256–60.
118. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Atlanta: CDC. Department of health and human services. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). 2012 CRE Toolkit. c2012 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf>.
119. European Centre for Disease Prevention and Control [Internet]. Stockholm: ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. c2011 [cited 2014 Mar 1]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110913_Risk_assessment_resistant_CPE.pdf.
120. ISKRA. Povjerenstvo za sprečavanje i suzbijanje bolničkih infekcija [Internet]. Zagreb; Ministarstvo zdravlja RH. Naputak za kontrolu širenja KPC *Klebsiella pneumoniae*. c2012 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.bolnica-zadar.hr/djelatnici.html>.
121. Saidel-Odes L, Polachek H, Peled N, Riesenberk K, Schlaeffer F, Trabelsi Y et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:14–9.
122. Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, Hadad S, Neuberger A, Hussein K et al. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. *Am J Infect Control* 2013;41:1167–72.
123. Falagas M, Rafailidis P. Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. *Clin Infect Dis* 2009;48:1729–31.
124. Bergen P, Li J, Nation R. Dosing of colistin-back to basic PK/PD. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:464–9.
125. Levy Hara G, Gould I, Endimiani A, Pardo PR, Daikos G, Hsueh PR et al. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: recommendations from an International Working Group. *J Chemother* 2013;25:129–40.
126. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J* 2011;104:40–5.
127. Matthaïou D, Michalopoulos A, Rafailidis P, Karageorgopoulos D, Papaïoannou V, Ntani G et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant Gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med* 2008;36:807–11.
128. Doan T, Fung H, Mehta D, Riska P. Tigecycline: a glycolcycline antimicrobial agent. *Clin Ther* 2006;28:1079–106.
129. Livermore D. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:S1–7.
130. US Food and Drug Administration. [Internet]. Silver Spring: FDA Drug Safety Communication. Increased risk of death with tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. c2010 [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm>.
131. Poulakou G, Kontopidou F, Paramythiotou E, Kompoti M, Katsiari M, Mainas E et al. Tigecycline in the treatment of infections from multi-drug resistant Gram-negative pathogens. *J Infect* 2009;58:273–84.
132. Daly M, Riddle D, Ledebøer N, Dunne W, Ritchie D. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2007;27:1052–7.
133. Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Merino P, Picazo J. *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:61–6.

134. Livermore D, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:415–9.
135. Taccone F, Cotton F, Roisin S, Vincent J, Jacobs F. Optimal meropenem concentrations to treat multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septic shock. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2129–31.
136. Lee G, Burgess D. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2012;11. [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552987/>
137. Hirsch E, Tam V. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119–25.
138. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2013;12. [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/12/1/22>.
139. Livermore D. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009;64(suppl 1):29–36.
140. Shlaes D. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1277:105–14.
141. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7693–7.
142. Palepou M, Woodford N, Hope R, Colman M, Glover J, Kaufmann M et al. Novel class A carbapenemase, KPC-4, in an *Enterobacter* isolate from Scotland. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(suppl 2):106.
143. Chen L, Chavda K, Fraimow H, Mediavilla J, Melano R, Jacobs M et al. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:269–76.
144. da Silva RM, Traebert J, Galato D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12:663–71.
145. Perez F, Endimiani A, Ray A, Decker B, Wallace C, Hujer K et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1807–18.
146. Gregory C, Llata E, Stine N, Gould C, Santiago L, Vazquez G et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:476–84.
147. Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, Benenson S, Moses A, Block C et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6057–9.
148. Hawser S, Bouchillon S, Lascols C, Hackel M, Hoban D, Badal R et al. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates from intra-abdominal infections and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3917–21.
149. Zhu J, Jiang R, Mi Z, Kong H, Zhang F. Novel KPC variant from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:1050–2.
150. Netikul T, Kiratisin P. Emergence of novel blaKPC-12 and blaKPC-13 variants in carbapenem nonsusceptible *Enterobacter cloacae*: a first report of blaKPC gene in Thailand. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(suppl 4):372.
151. Queenan A, Torres-Viera C, Gold H, Carmeli Y, Eliopoulos G, Moellering RJ et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3035–9.
152. Queenan A, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3485–7.
153. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos A, Tzouveleki L. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234:209–13.
154. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2905–10.
155. Bae I, Lee Y, Jeong S, Hong S, Lee J, Lee S et al. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:465–8.
156. Jeong S, Bae I, Kim D, Hong S, Song J, Lee J et al. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4809–10.
157. Lee S, Jeong S. Nomenclature of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2148–50.
158. Patel G, Bonomo R. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* [Internet]. 2013;4. [cited 2014 Mar 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596785/>
159. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:71–8.
160. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller R, Frangeberg H, Stiewe D et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2125–8.
161. Castanheira M, Deshpande L, Mathai D, Bell J, Jones R, Mendes R. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1274–8.
162. Potron A, Nordmann P, L P. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase

- from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:633–6.
163. Wolter D, Kurpiel P, Woodford N, Palepou M, Goering R, Hanson N. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:557–62.
 164. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1261–2.
 165. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3593–7.
 166. Kotsakis S, Papagiannitsis C, Tzelepi E, Legakis N, Miriagou V, Tzouveleki L. GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1331–3.
 167. Castanheira M, Toleman M, Jones R, Schmidt F, Walsh T. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4654–61.
 168. Toleman M, Simm A, Murphy T, Gales A, Biedenbach D, Jones R et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:673–9.
 169. Sevillano E, Gallego L, García-Lobo J. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol* 2009;57:493–5.
 170. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2043–8.
 171. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki L, Sofianou D, Legakis N et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006;12:981–3.
 172. Riccio M, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1229–35.
 173. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang E, Palepou M, Lyon D, Woodford N et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:710–4.
 174. Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Kubo T, Tsunoda M, Lyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 2000;38:526–9.
 175. Karthikeyan K, Thirunarayan M, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2253–4.
 176. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus T, Gatermann S, Bonnin R, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1260–2.
 177. Lee K, Yum J, Yong D, Lee H, Kim H, Docquier J et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4485–91.
 178. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore D. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:583–8.
 179. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:428–32.
 180. Brown S, Young H, Amyes S. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:15–23.
 181. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:202–8.
 182. Higgins P, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5035–8.
 183. Kim C, Lee Y, Lee H, Woo G, Song W, Kim M et al. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:432–8.
 184. Higgins P, Pérez-Llarena F, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a Novel Class D β -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2121–6.