



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје

Медицински факултет

Институт за микробиологија и паразитологија

Научно-истражувачки проект:

**КАРБАПЕНЕМАЗА-ПРОДУЦИРАЧКИ ЕНТЕРОБАКТЕРИИ -  
АКТУЕЛЕН ПРОБЛЕМ ВО КЛИНИЧКАТА ПРАКТИКА**

Главен истражувач:

Проф. д-р Ана Кафтанциева

Скопје, 2021

- Проектот беше финансиран од Медицинскиот факултет, УКИМ, Скопје

### Носител на проектот: Проф. д-р Ана Кафтанџиева

Активности на носителот на проектот:

Собирање на соевите од фамилијата ентеробактерии, кои со рутинското тестирање покажаа намалена осетливост на карбапенеми, водење евиденција за сите изолати, собирање податоци за пациентите од кои беа изолирани соевите, примена на фенотипските тестови за детекција на продукцијата на карбапенемази, анализа на добиените податоци, како и анализа на податоците од молекуларното испитување, пишување на проектот, презентација на дел од податоците од проектот на повеќе научни собири итн.

### Учесници во проектот и нивни активности

Проф. д-р Гордана Јанкоска Проф. д-р Милена Петровска	Селекција на ентеробактериите кои покажаа намалена осетливост на карбапенеми при микробиолошка обработка на урини
Виш науч. сор. д-р Весна Котевска Науч сор. д-р Гордана Мирчевска	Селекција на резистентни ентеробактерии при микробиолошка обработка на примероци од горни и долни дишни патишта
Проф. д-р Жаклина Цековска	Селекција на резистентни ентеробактерии при микробиолошка обработка на примарно стерилни примероци (хемокултури и ликвори)
Лаборант Оливера Витанова	Обработка на примероци од рани, примена на фенотипски тестови за детекција на карбапенемаза-продуцирачки ентеробактерии, чување на сите изолати со нивно засадување во длабок агар
Специјалист за микробиолошки анализи Надица Ристовска	Обработка на примарно стерилните примероци, работа со Vitek, следење на сите карбапенем-резистентни изолати и детекција на гените на резистенција на карбапенеми со Amplex
Специјалист за микробиолошки анализи Анета Кузмановска	Обработка на примероци од респираторни патишта, следење на сите карбапенем-резистентни изолати и работа со Vitek
Лаборант Славица Младеновска Лаборант Ленче Трифуновска	Обработка на урини и следење на сите карбапенем-резистентни изолати

## Содржина

1. Вовед	4
2. Мотив за изработка на проектот	10
3. Цели на проектот	11
4. Материјал и методи	12
4.1. Соеви	12
4.1.1. Критериуми за вклучување во студијата	12
4.1.2. Критериуми за исклучување од студијата	12
4.1.3. Контролни соеви	13
4.2. Одредување на осетливост на бактериите кон антимикуробни средства	13
4.2.1. Стандарден диск дифузионен метод	13
4.2.2. Одредување на МИК	13
4.3. Одредување на продукцијата на карбапенемази со СИМ-метод	14
4.4. Фенотипско одредување на типот на карбапенемаза со употреба на карбапенемаза сет	15
4.5. Одредување на гените што кодираат синтеза на карбапенемази и бета-лактамази со проширен спектар	16
4.6. Статистичка анализа	19
5. Резултати	20
5.1. Преваленца и дистрибуција на CR-соеви на ентеробактерии	20
5.2. Испитување на осетливоста на CR-изолати кон различни групи антимикуробни средства	29
5.3. Детекција на гените кои кодираат продукција на карбапенемази кај бактерии од фамилијата <i>Enterobacterales</i>	33
6. Дискусија	36
6.1. Преваленца на карбапенемаза продуцирачки ентеробактерии	36
6.2. Осетливост на соевите на <i>K. pneumoniae</i> и други ентеробактерии што продуцираат карбапенемази кон различни групи антимикуробни агенси	39
6.3. Глобално ширење на различните типови на карбапенемази	42
7. Заклучоци	45
8. Литература	47

## Листа на кратенки

УКЦ	Универзитетски клинички центар
ГОб	Градска општа болница
СБХБ	Специјална болница за хируршки болести
РВР	Penicillin binding proteins (пеницилин врзувачки протеини)
ESBL	Extended spectrum beta-lactamases (бета лактамази со проширен спектар)
AmpC	Бета-лактамази од група C
ATCC	American Type Culture Collection
UKNEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service
EuSCAPE	European Survey on Carbapenemase-Producing <i>Enterobacteriaceae</i> in Europe
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CRE	Carbapenem-resistant bacteria
CPE	Carbapenemase-producing bacteria
ЕИЛ	Единица за интензивно лекување
МИК	Минимална инхибиторна концентрација
СИМ	Carbapenem inactivation method

## 1. Вовед

Резистенцијата на бактериите кон антимиќробните средства се појавила многу брзо по воведување на антибиотиците во клиничката пракса. Бактериите развиле различни механизми на резистенција, која може да биде ензимска и неензимска. Стекнатата резистенција може да се пренесе на потомството, преку пренесување на гените лоцирани на хромозомите. Гените може да се пренесуваат и преку мобилни генетски елементи, како плазмиди, транспозони, интегрони или преку бактериофаги и на тој начин може да се пренесуваат хоризонтално меѓу бактерии од исти или различни родови. Затоа, ширењето на гените на резистенција е многу брзо. Влијание има и селективниот притисок кој настанува со прекумерна употреба на антибиотици. На тој начин се овозможува преживување на резистентни клонови и нивно ширење меѓу луѓето, животните и преку контаминирање на животната средина (1).

Во последните години особена важност се придава на инфекциите предизвикани со резистентни Грам-негативни бактерии. Најчест механизам на резистенција на Грам-негативните бактерии кон антибиотици е продукција на ензими (резистенција на бета лактами и резистенција на аминогликозиди); промена на целното место (PBP-penicillin binding proteins за бета лактамите, DNA gyrase за кинолоните), ефлукс пумпа (резистенција на тетрациклини и кинолони) и промените кои настануваат во клеточниот ѕид (губење на порините) што резултира со редуцирано навлегување на антибиотикот во бактериската клетка (резистенција на бета лактами). Особено голем проблем во последните години претставува појавата на мултирезистентни соеви на бактерии од фамилијата Ентеробактерии. Мултирезистенцијата означува резистенција или намалена осетливост на бактеријата кон најмалку еден антибиотик од три или повеќе класи на антимиќробни агенси. Ова е особено важно заради недостаток на ефикасни антибиотици за третман на инфекциите предизвикани од овие бактерии (2).

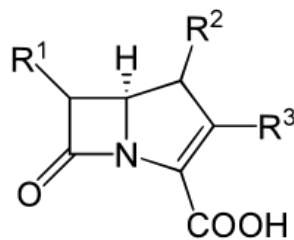
Ентеробактериите се Грам-негативни бацили кои се дел од нормалната цревна флора, но може да предизвикаат инфекции кај луѓето. Овие бактерии се наоѓаат во голем број во цревата и се во многу близок меѓусебен контакт, при што може лесно да настане пренесување на гени преку трансфер на плазмиди и транспозони. Затоа појавата на мултирезистенција кај ентеробактериите е честа и претставува значаен проблем во клиничката практика (3).

*Klebsiella pneumoniae* припаѓа на фамилијата *Enterobacteriaceae*, која може да се најде во дигестивниот тракт, на кожата кај луѓето, како и во болничка средина, на медицински инструменти. Често предизвикува инфекции кај имунокомпромитирани пациенти. Најчесто предизвикува уринарни инфекции, инфекции на рани и сепса. Најзначаен фактор на вируленција кај клебсиелата е капсуларниот полисахарид. Хипервирулентните соеви на *Klebsiella pneumoniae* се многу инвазивни и може да предизвикаат тешки инфекции кај претходно здрави индивидуи (апсцес на хепар, менингит, некротизирачки фасциит, пневмонија) (4). Денес се најчести интрахоспиталните инфекции предизвикани од *Klebsiella pneumoniae*. Овие инфекции често имаат хроничен тек заради способноста на бактериите да формираат биофилм (кој ги заштитува бактериите од имуниот систем и од антибиотиците), како и заради мултирезистентниот фенотип на овие бактерии (5).

Во терапија на инфекции предизвикани со ентеробактерии најчесто се користат бета-лактамски антибиотици (бета лактами со инхибитори на бета-лактамази-клавуланска киселина, сулбактам и тазобактам; цефалоспорини со проширен спектар (цефтазидим, цефотаксим, цефепим) и карбапенеми (имипенем, меропенем, ертапенем), флуорокинолони и аминогликозиди (3).

### Карбапенеми

Карбапенемите се антибиотици, кои припаѓаат во класата на бета-лактамски антибиотици, кои се многу слични со пеницилините, но атомот на сулфур во молекулата од позиција 1 е заменет со атом на јаглерод (carbon), па од таму и името на целата група - карбапенеми.



Карбапенемите имаат широк спектар на антибактериска активност и се отпорни на разградување од страна на повеќето ензими (бета-лактамази). Овие антибиотици потекнуваат од карбапенемот thienamycin, природен продукт од габичката *Streptomyces cattleyi*. Карбапенемите се антибиотици од последен избор (златна резерва) при многу бактериски инфекции, како што се оние предизвикани од резистентни *E. coli* и *K. pneumoniae*. Особено е значајно тоа што тие имаат помалку несекани ефекти во однос

на другите резервни антибиотици, како што се полимиксините (6). Во групата карбапенеми припаѓаат: имипенем, меропенем, ертапенем и дорипенем. Сите се аплицираат интравенски, освен ертапенемот, кој може да се аплицира и интрамускулно. Карбапенемите се употребуваат во третман на бактериски менингит, сепса со непознато потекло, нозокомијална пневмонија, итн. Во однос на бактериите, најдобро делуваат на *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (*Morganella spp*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *E. coli* и *Klebsiella spp* што продуцираат различни типови бета-лактамази, како ESBL или AmpC). Спектарот на нивното делување опфаќа и бактерии од родот *Streptococcus*, метицилин сензитивен *Staphylococcus aureus* (MSSA), како и анаеробни бактерии.

Појавата на резистенција кон карбапенемите е значајна од многу причини. Прво, се ограничува можноста за третман на живото-загрозувачки инфекции, а особено фактот што нема нови антибиотици кои би делувале на Грам-негативните бактерии. Второ, резистенцијата се шири брзо меѓу бактериските соеви заради механизмите кои ги развиваат бактериите, заради селективниот притисок од неконтролираната примена на антибиотици, како и заради неможноста од брза и прецизна детекција на резистентните соеви. Затоа, брза детекција на резистенцијата и лимитирање на ширењето на резистентните соеви се неопходни мерки за контрола на инфекциите во болничка средина.

Инфекции со овие соеви најчесто се јавуваат кај хоспитализирани пациенти со ко-морбидитети, честа или пролонгирана хоспитализација, со катетри (ЦВК, уринарни итн), кои примаат антибиотици (ванкомицин, флуорокинолони и цефалоспорини со широк спектар). Најчесто овие бактерии се изолираат од урина или од хемокултура.

Резистенцијата на бактериите кон карбапенеми се должи на два механизми:

- Способност на бактеријата да продуцира карбапенеми (бета-лактамази кои ги разградуваат карбапенемите)
- Продукција на цефалоспоринази, комбинирана со губење на порините

Создавањето на ензими цефалоспоринази (ESBL или AmpC цефалоспоринази) кои имаат низок степен на активност кон карбапенемите, во комбинација со дефект во порините (кои го оневозможуваат навлегувањето на антибиотикот до периплазматскиот простор на бактериската клетка) доведува до намалена активност на карбапенемите. Со оглед на тоа дека соевите што продуцираат карбапенеми се често

резистентни и на други групи на антимикуробни средства, тераписките опции на инфекциите се многу ограничени (7,8,9,10).

### **Бета-лактамази**

Ензимите (бета-лактамази) се главен механизам на резистенција на ентеробактериите кон бета-лактамските антибиотици. До сега се детектирани околу 1300 различни видови бета-лактамази со променливо ниво на експресија и различни супстрати на кои го манифестираат своето дејство.

Супстрати може да бидат:

#### **а) Пеницилини**

- Бета-лактамази со тесен спектар (TEM, SHV, OXA)
- Бета-лактамази со проширен спектар (ESBL)
- Бета-лактамази (TEM) резистентни на инхибитори (IRT)

#### **б) Цефалоспорини**

- Цефуросимази
- Индуцибилни AmpC цефалоспоринази

#### **в) Карбапенеми**

- Карбапенемази

### **Класификација на бета-лактамазите**

Амблер, врз основа на молекуларната структура, ги групирал бета-лактамазите во 4 основни класи:

- Класа А: TEM-1, TEM-2; SHV-1; ESBL, KPC (имаат серин во активниот центар и се инхибираат со инхибитори на бета-лактамази)
- Класа В: метало-бета лактамази (имаат Zn во активниот центар и се инхибираат со EDTA)
- Класа С: AmpC (имаат серин во активниот центар, делуваат на цефамицините и се инхибираат со cloxacillin, oxacillin, aztreonam).
- Класа D: OXA (имаат серин во активниот центар) (11)

### **Карбапенемази**

Гените кои ги кодираат карбапенемазите се наоѓаат на мобилни генетски елементи, со што се овозможува нивен брз пренос. Клинички значајни се



карбапенемазите од класа А, В и D според Амблер. Најчесто се јавуваат во болничките изолати на *Klebsiella pneumoniae*, а поретко кај *E. coli* (12,13,14).

Табела 1. Биохемиски карактеристики на клинички значајните карбапенемази

Молек. класа	β-лактамази	Супстрат (β-лактами)					Инхибитори на β-лактамазите
		Пеницилини	1 и 2 ген. цефалоспорини	3 и 4. ген. цефалоспорини	Монобактами	Карбапенемами	Инхибирани од:
А	KPCs	+	+	+	+	+	Борна киселина (клавул. кис, тазобактам)
В	VIM, NDMs	+	+	+	-	+	EDTA/Дипиколинична кис
D	OXA-48 и слични на неа	+	+	-	-	+	NaCl

### **Карбапенемази од молекуларна класа А**

Овие ензими имаат способност да хидролизираат пеницилини, цефалоспорини, карбапенемами и азтреонам. Може да се инхибираат со борна киселина и со инхибитори на бета лактамази (клавуланска киселина и тазобактам). Овие ензими може да бидат хромозомски кодирани (SME), плазмидски кодирани (KPC, GES) или и хромозомски и плазмидски (IMI).

Карбапенемазата KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) е најзначаен ензим од класа А. Таа е денес најзастапена карбапенемаза во Европа. Прв пат е идентификувана во САД во 1996 година (15). За неколку години се проширила во Јужна Америка, Израел, Кина, Грција и други европски земји. Освен кај *Klebsiella pneumoniae*, овие ензими се најдени и кај *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*. KPC ензимите се најдени и кај изолати на *Pseudomonas aeruginosa*. Плазмидите, освен KPC гени, носат и други гени, кои кодираат резистенција кон други бета-лактами, аминогликозиди и флуорокинолони (16).

### **Карбапенемази од молекуларна класа B**

Овие ензими се наречени метало-бета-лактамази, бидејќи имаат јон на цинк во нивниот активен центар. Тие хидролизираат широк спектар на бета-лактамски антибиотици (пеницилини, цефалоспорини и карбапенеми, со исклучок на монобактами). Може да се инхибираат само со EDTA или слични хелаторни агенсии (17). Најзначајни фамилии на стекнати метало-бета-лактамази се VIM, IMP и NDM.

- VIM-1-ензимот (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) прв пат е најден во Италија во 1997 година. Наскоро е опишан VIM-2 во изолат на *Pseudomonas aeruginosa* во Франција. Денес постојат над 40 варијанти на овој ензим, воглавно присутни кај изолати на *Pseudomonas aeruginosa*. VIM-2 ензимот е најчеста метало-бета-лактамаза во светот, со ендемско јавување во Јужна Европа и Југоисточна Азија. Грција претставува ендемско подрачје за ентеробактериите кои продуцираат VIM-1. Иако најчесто се јавува кај изолати на *Klebsiella pneumoniae*, VIM-1 се детектира и кај *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia spp.* и *Klebsiella oxytoca* (18).

- Ензимот IMP-1 е детектиран во 1988 година во Јапонија во изолат од *Pseudomonas aeruginosa*. Се смета дека селекцијата на гени кои кодираат IMP настанала заради широка примена на имипенемот во Јапонија. Денес има околу 48 варијанти, кои може да се најдат кај *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp* и *Acinetobacter spp*, најчесто во Јапонија, Тајван и Кина. Често овие гени се наоѓаат заедно со другите гени на резистенција, па се појавува и корезистенција кон аминокликозиди и бета-лактамази од класа D (19).

- Ензимите од групата NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) се клинички најзначајни карбапенемази. NDM-1 карбапенемазата прв пат е детектирана во Шведска во 2008 година од изолат на *K. pneumoniae* и *E. coli* кај пациент кој бил претходно лечен во Њу Делхи, Индија. До сега се откриени 12 варијанти на ензимот. Гените за NDM-1 се лоцирани на плазмиди и најчесто се присутни кај *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, а поретко и кај *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus spp* и *Providencia spp*. Покрај индискиот потконтинент (Индија, Пакистан, Шри Ланка) кој претставува резервоар за овие соеви, тие се присутни насекаде, од Велика Британија, до многу земји во Азија, Африка, Австралија, Америка и во Европа. Балканот, Блискиот Исток и Северноафриканските земји се секундарен резервоар на соевите кои продуцираат NDM бета-лактамази, што се потврдува со фактот дека нема никакви докази за било каква поврзаност со индискиот потконтинент (19,20,21).

## **Карбапенемази од молекуларна класа D**

ОХА-ензимите кои ги хидролизираат карбапенемите покажуваат послаба хидролитичка активност кон карбапенемите во однос на другите класи на карбапенемази и не ги хидролизираат цефалоспорините со проширен спектар. Овие ензими не може да се инхибираат од инхибиторите на бета лактамази. Во *in vitro* услови инхибиторно дејство може да има NaCl. Оксацилиназите може да се класифицираат во неколку подгрупи. Најголем дел од нив се јавуваат кај *Acinetobacter baumannii*, а ОХА-48 е најчест меѓу изолати на *K. pneumoniae*, како и меѓу други родови од фамилијата *Enterobacteriaceae*. Ензимот ОХА-48 прв пат е детектиран кај *Klebsiella pneumoniae* во 2003 година во Турција, а денес е детектиран и кај други ентеробактерии, како *E. coli* и *Enterobacter cloacae*. Чести се болнички епидемии во Турција, Јужна Европа и Африка. Носител на гените blaОХА-48 е плазмид со големина од 62 kb и тој обично не поседува други гени на резистенција. ОХА-48-like ензими се варијанти на ензимот ОХА-48 кои имаат ист спектар на хидролитичка активност, а се разликуваат само во неколку аминокиселини. Таков е ензимот ОХА-162 најден во Турција, кој од ОХА-48 се разликува само во една аминокиселина. Варијантата ОХА-163 е најдена кај изолати во Аргентина, а ОХА-181 е најдена кај ентеробактерии во Индија (22,23,24).

## **2. Мотив за изработка на проектот**

Бактериите од фамилијата ентеробактерии што се резистентни на карбапенеми, заедно со метицилин резистентните стафилококи, ванкомицин резистентните ентерококи, како и неферментативните бактерии што продуцираат карбапенемази, претставуваат сериозен проблем во клиничката пракса и најчеста причина за нозокомијални инфекции. Повеќе од 25 000 луѓе во Европа умираат секоја година од инфекции предизвикани со резистентни бактерии. Појавата на резистенција кон карбапенемите го зголемува процентот на морталитет од 24-70%, го продолжува престојот во болница, ги зголемува трошоците за хоспитализација и за терапија.

Гените кои кодираат резистенција кон карбапенемите често се лоцирани на плазмидите, кои покрај овие гени, содржат и гени кои кодираат резистенција кон не-бета-лактамски антибиотици. Затоа, можностите за терапија се лимитирани, а тоа директно влијае на клиничкиот исход. Друг проблем е потребата од дополнителни

тестови за детекција на соевите резистентни на карбапеними. Заради различниот афинитет кон одделни супстрати (карбапеними), како и заради различното ниво на продукција на карбапенемазите, дел од овие соеви може да не се детектираат во рутинската работа при тестирање на осетливоста кон антибиотици. Затоа, постои можност терапијата која се препорачува да не делува и да се овозможи ширење на бактериите во болничката средина. Карбапенем-резистентните бактерии често се изолираат од хоспитализирани пациенти во многу медицински установи на различни земји и големи географски региони. Од Република Македонија се објавени податоци само за соеви пријавени во рамките на Европскиот проект за детекција на карбапенем-резистентни ентеробактерии во Европа кој се работеше во период од 6 месеци во 2013 година, во кој период беа пријавени само 3 изолати на *K. pneumoniae* резистенти на карбапеними. До сега не постојат други објавени податоци за преваленцата и дистрибуцијата на овие соеви во нашата средина, типот на ензимите кој доминира во нашата средина, како и поврзаноста на различните типови ензими со резистенцијата кон антимикуробни агенси (25). Сите овие сознанија претставуваа мотив за дизајнирање на студија.

### 3. Цели на проектот

1. Да се одреди преваленцата и дистрибуцијата на карбапенем-резистентни соеви на ентеробактерии од пациенти хоспитализирани во Универзитетските клиници во комплексот „Мајка Тереза“ во Скопје, во Градската општа болница „8. Септември“, како и во Специјалната болница за хируршки болести „Св. Наум Охридски“ во Скопје.
2. Да се одреди осетливоста на карбапенем-резистентните изолати кон различни групи антимикуробни агенси (бета-лактамски и не-бета-лактамски антибиотици)
3. Кај изолатите кои продуцираат карбапенемази, да се одреди типот на карбапенемазата, преку детекција на гените кои го кодираат нивното создавање.

## **4. Материјал и методи**

Студијата е дизајнирана како ретроспективно-проспективна студија, која се изведе во период од четири години (2017-2020), на Институтот за микробиологија и паразитологија на Медицинскиот факултет, УКИМ, Скопје.

### **4.1. Соеви**

Сите примероци (примероци од рани, урини, крв за хемокултура, трахеални аспирати итн.) добиени од пациенти хоспитализирани во Универзитетските клиници во комплексот „Мајка Тереза” во Скопје, Градската болница „8 Септември” и специјалната болница за хируршки болести „Св. Наум Охридски” во Скопје собирани во период од четири година (2017-2020) се обработени во лабораториите на Институтот за микробиологија и паразитологија. Изолацијата и идентификацијата на микроорганизмите е направена со употреба на стандардни микробиолошки техники.

#### **4.1.1. Критериуми за вклучување во студијата**

1. Соеви кои потекнуваат од следните примероци, земени од хоспитализирани пациенти: урина, трахеален аспират, аеробна хемокултура, примероци од рана, брис од ендотрахеален тубус и канила
2. Со стандардни методи за изолација и идентификација, соевите да припаѓаат на фамилијата *Enterobacteriaceae*
3. При повеќе идентични соеви изолирани од ист пациент, во испитувањето се вклучува само еден сој

#### **4.1.2. Критериуми за исклучување од студијата**

1. Бактерии кои се изолираат од фецес, а се дел од нормалната бактериска флора
2. Соеви кои се осетливи на карбапенеми
3. Бактерии кои ќе се контаминираат или изменат во тек на чување во длабок агар или при пресадување
4. Соеви кои ќе се селектираат со скрининг тестови, но нема да се потврдат со фенотипски конфирматорни тестови.

По изолација, идентификација и одредување на осетливоста со стандардни тестови, како и по примена на фенотипските тестови за детекција на продукцијата на

карбапенемази, сите соеви до примена на молекуларни методи се чуваа во Феликс-ов длабок агар на собна температура.

За секој изолиран и идентификуван сој се водеше евиденција со податоци за потекло на сојот (име и презиме на пациентот, клиниката каде пациентот е хоспитализиран и видот на примерокот испратен за микробиолошка анализа).

#### **4.1.3. Контролни соеви**

За сите фенотипски методи за детекција на продукцијата на карбапенемази, како и за молекуларното испитување, се користеа тест соеви. Сојот на *K. pneumoniae* ATCC 700603 (American Type Culture Collection, USA), кој продуцира бета-лактамаза SHV-18, се користеше како негативна контрола. Како позитивни контроли се користеа соевите од екстерната контрола од UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service), кои се добиени како дел од европскиот проект за детекција на ентеробактериите кои продуцираат карбапенемази - EuSCAPE (European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Europe). Користени беа следните изолати: 1943 *Klebsiella pneumoniae* за генот blaOXA-48-like, 1944 *Klebsiella pneumoniae* за генот blaKPC, 1945 *Klebsiella pneumoniae* за генот blaVIM, 1947 *Klebsiella pneumoniae* за генот blaIMP и 1948 *Klebsiella pneumoniae* за генот blaNDM од екстерната контрола со број 3424 UK NEQAS .

## **4.2. Одредување на осетливост на бактериите кон антимикробни средства**

### **4.2.1. Стандарден диск дифузионен метод**

За одредување на осетливоста на бактериите кон 16 антимикробни агенси се правеше стандарден диск дифузионен метод (ампицилин, амоксицилин, амоксицилин/клавуланска киселина, пиперацилин/тазобактам, ертапенем, имипенем (IMI), меропенем (MEM), цефуроксим, цефтриаксон, цефтазидим (CAZ), цефепим, гентамицин, амикацин, ципрофлоксацин, котримоксазол и колистин). Толкувањето на добиените резултати се правеше според EUCAST-стандардите.

### **4.2.2. Одредување на минималните инхибиторни концентрации (МИК)**

За одредување на МИК за карбапенемите (имипенем, меропенем) се користеше E-тест и Vitek, а за одредување МИК за другите класи на антимикробни средства се користеше само автоматизираниот метод -Vitek 2.

За сите соеви кои со стандардните методи за одредување на осетливоста (диск дифузионен метод и одредување на МИК) покажаа намалени зони на инхибиција на раст или помал МИК од оној препорачан според EUCAST- критериумите во однос на карбапенемите, се направија фенотипски тестови за одредување на продукцијата на ензимите (карбапенемази) (27).

Табела 2. Дел од EUCAST-критериумите со граничните вредности за *in vitro* одредување на продукцијата на карбапенемази

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem <sup>1</sup>	≤2	>0.12	≥22	<25 <sup>2</sup>
Imipenem <sup>3</sup>	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem <sup>4</sup>	≤0.5	>0.12	≥25	<25

#### 4.3. Одредување на продукцијата на карбапенемази со CIM-метод (carbapenem inactivation method)

За изведување на CIM-методот се земаат повеќе колонии од бактеријата која ја испитуваме, а која претходно е засадена на Mueller-Hinton или крвен агар. Се зема полна еза од 10 µl од пораснатите колонии и се суспендираат во 400 µl вода. Ова може да се направи во Епендорфова епрувета. Потоа во суспензијата се додава диск што содржи 10 µg меропенем и се инкубира на 35°C минимум 2 часа. По инкубацијата, дискот внимателно со еза се вади од суспензијата и се поставува на површината на Mueller-Hinton, на кој е претходно засаден осетлив сој на *E.coli* ATCC 29522 со заматување од 0,5 McFarland. Ако бактеријата која ја испитуваме продуцира карбапенемази, тогаш дискот со меропенем е инактивиран и сојот на *E. coli* ќе расте до самиот диск на меропенем. Ако сојот не продуцира карбапенемази, тогаш околу дискот со меропенем ќе се гледа јасна зона на инхибиција на раст. Најдобро е резултатите да се читаат по инкубација од 18 часа, но видливи резултати може да се добијат и по инкубација од 6 часа (28,29).

#### 4.4. Фенотипско одредување на типот на карбапенемаза со употреба на комерцијален кит - карбапенемаза сет (Carbapenemase set, Mast Diagnostic D70C)

Овој тест се изведува со 5 различни дискови, кои содржат:

5. меропенем од 10 $\mu$ g
6. меропенем+инхибитор на метало-бета лактамаза (дипиколинична киселина)
7. меропенем+инхибитор на КРС+AmpC (фенил борна киселина или аминок-фенил борна киселина)
8. меропенем+инхибитор на AmpC-бета-лактамази (клоксацилин)
  5. темоцилин од 30 $\mu$ g (30,31)

Интерпретацијата на тестот се врши според следната шема:

Зголемување на зоните на инхибиција на раст споредено со зоната околу дискот А			Зона на инхибиција	Интерпретација
Диск В	Диск С	Диск D	Диск Е	
< 3 mm	< 4 mm	< 3 mm	> 10 mm	Не продуцира карбапенемаза
$\geq$ 5 mm	< 4 mm	< 4 mm	> 10 mm	Продуцира метало-бета лактамаза
< 3 mm	$\geq$ 4 mm	< 3 mm	> 10 mm	Продуцира КРС
< 3 mm	$\geq$ 4 mm	$\geq$ 5 mm	> 10 mm	Продуцира AmpC+импермеабилност
< 3 mm	< 4 mm	< 3 mm	$\leq$ 10 mm	Продуцира ОХА-48

Сите овие тестови беа применети за изолатите од хоспитализирани пациенти во период од четири години (2017-2020), кои се чуваа во длабок агар на собна температура. Од сите изолати кои покажаа намалена осетливост кон карбапенемите со примена на фенотипските тестови, по случаен избор беа селектирани 85 изолати, кај кои беа детектирани гените кои кодираа синтеза на бета-лактамази со примена на Amplex-молекуларниот тест.



#### 4.5. Одредување на гените што кодираа синтеза на карбапенемази и бета-лактамази со проширен спектар

**Eazyplex® SuperBug CRE** (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) е квалитативен метод за *in vitro* детектирање на бактерии, кои се способни, од генетичка гледна точка, да продуцираат различни типови на карбапенемази. Ова се изведува со детектирање на специфична секвенца од нуклеинската киселина (DNA) од бактериски колонии, ректален брис, урина или од позитивна хемокултура.

Eazyplex® SuperBug CRE ги детектира најчесто опишаните варијанти на метало-бета лактамази, како VIM-, NDM-, KPC- типовите, како и OXA-48 фамилијата и OXA-181. Како дополние, може да ги детектира и бета-лактамазите со проширен спектар (ESBL) од CTX-M-1-групата и CTX-M-9-групата.

Тестот се изведува, на почеток мануелно (процесот на подготовка), а потоа се изведува автоматизирано со апаратот за амплификација и мерење.

Продуктите на амплификацијата кои се добиваат со изотермална амплификација (loop-mediated isothermal amplification-LAMP) се визуализираат со мерење на флуоресценцијата од флуоресцентната боја врзана за двоверижната DNA со употреба на инструментот GENIE II (OptiGene, Horsham, UK).

**Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)** или изотермална амплификација што се изведува со посретство на петелка, користи 4-6 прајмери, кои препознаваат 6-8 различни региони на таргет DNA, за високо специфична реакција на амплификација. DNA полимеразата ја започнува синтезата, а два специјално дизајнирани прајмери формираат структура на петелка за да се забрзаат циклусите на амплификација преку екстензија на петелката и дополнително закачување на прајмерите (additional annealing of primers). DNA продуктите се многу долги (>20 kb) и настануваат со бројни повторувања на кусата (80–250 bp) таргет секвенца.

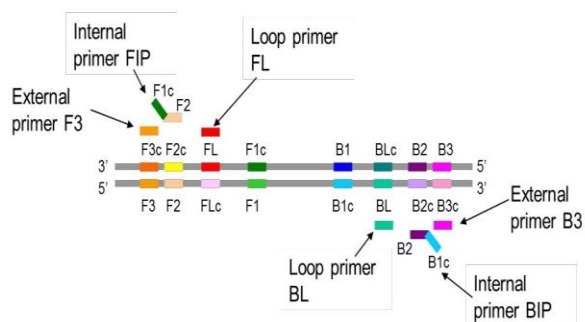
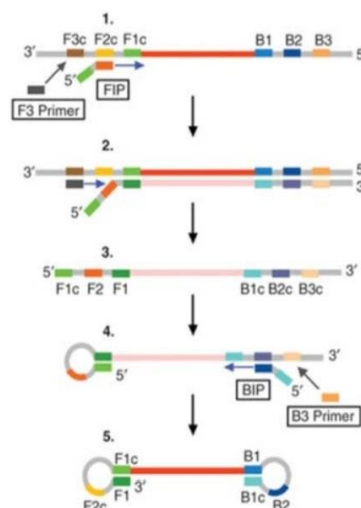


Figure: <http://loopamp.eiken.co.jp/ellamp/principle.html>

FIP (Forward Inner Primer)  
 F3 (Forward Outer Primer)  
 FL (Forward Loop Primer)

BIP (Backward Inner Primer)  
 B3 (Backward Outer Primer)  
 BL (Backward Loop Primer)

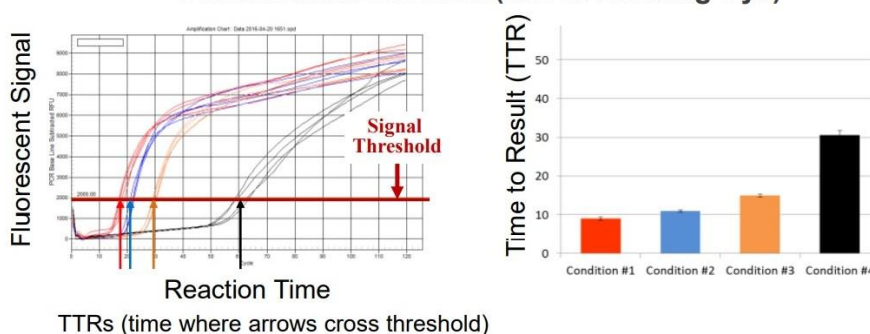


**Шема 1.** Изведување на изотермална амплификација што се изведува со посретство на петелка (Loop-mediated isothermal amplification-LAMP)

### Принцип на тестот

Поединечните тестови (Single eazyplex® test strip) содржат 6 олигонуклеотидни прајмери, што овозможува симултана, специфична амплификација на различни гени во една единствена изотермална реакција на амплификација. Во присуство на релевантна секвенца на DNA, специфичните продукти на амплификација се визуализираат со мерење на флуоресценцијата во вистинско време (real-time fluorescence measurement) од флуоресцентна боја која се врзува за двојно-верижната DNA.

### Fluorescent Detection (dsDNA binding Dye)



Позитивен сигнал означува јасна генотипска детекција на присуството на резистенција, односно детекција на соодветен ген кој го испитуваме во примерокот. Интерпретација на резултатите е базирана на алгоритам во софтверот (eazyReport™ software).

### Содржина на тестот

Секој кит содржи:

- Тест стрип – составен од 8 полни епрувети, секоја од нив содржи лиофилизирана, подготвена за употреба (ready-to-use) мешавина за изотермална

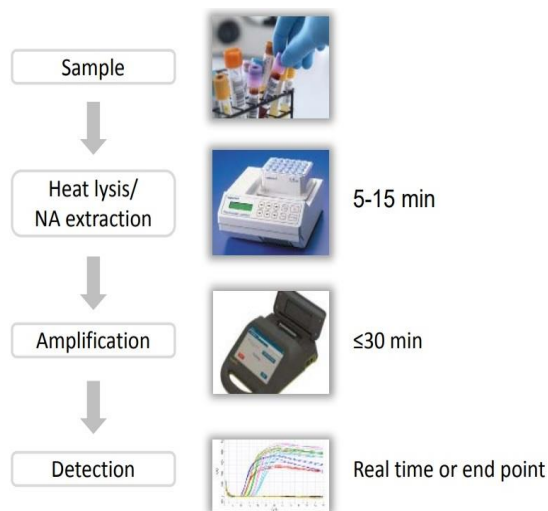
амплификација. Мешавината содржи: DNA-полимераза, пуфер, Mg2SO4, dNTPs, олигонуклеотидни прајмери и флуоресцентна боја.

- „RALF - Resuspension and Lysis Fluid“- течност за ресуспензија и лиза за секој стрип посебно

### Подготовка на реакцијата на амплификација од бактериска колонија од хранитална подлога:

Се суспендира многу мал дел од една бактериска колонија во 500 µl RALF со инокулациона игла. Кога на иглата ќе се забележи клеточен материјал, тоа е сосема доволно за изведување на тестот. Она што е многу важно е да не се земе премногу материјал од бактериската колонија, бидејќи голема количина на клеточен материјал ја намалува ефективноста на реакцијата и води до грешен резултат. Потоа се инкубира RALF-суспензијата на 99°C за 2 минути за да настане лизирање на клетките.

Внимателно се отстранува алуминиумската фолија од тест стрипот. Се пипетираат 25 µl од RALF-суспензијата во ready-to-use микстурата во секоја од епруветките од тест стрипот, избегнувајќи го контактот на врвот од пипетата со талогот од епруветките. Не се вортексира, туку јако се протресува. Со нежно тапкање на стрипот се отстрануваат меурчињата воздух. Откако талогот ќе се раствори, стрипот веднаш се става во апаратот GENIE® II Mk2 и се пушта да работи.



### Евалуација

Изведувањето на реакцијата може да биде мониторирано во реално време. Позитивна реакција се набљудува преку појава на флуоресцентен сигнал, во вид на амплификациона крива.

Позитивна контрола: валидна контрола се означува со црвена боја.

## Интерпретација на резултатите

Позитивни резултати добиени со eazuplex® SuperBug CRE системот означува присуство на гени за резистенција во примерокот. Детекцијата на гените кои кодираат продукција на карбапенемази, како и ко-експресија на гени кои кодираат продукција на бета-лактамази со проширен спектар (ESBL) се изведува за период од петнаесеттина минути од една единствена бактериска колонија според препораките од производителот (<http://www.huplex.de>) (32). Но, присуството на тие гени не секогаш е и фенотипски манифестирано. Тоа значи дека бактеријата од примерокот има потенцијал за експресија на детектираните гени.

Овој систем нема улога во поставување на дијагноза на инфекции со бактерии кои се резистентни на карбапенеми или бета-лактами со проширен спектар, бидејќи не може да направи разлика помеѓу колонизација или инфекција, ниту пак да посочи или следи употреба на антибиотска терапија. Клиничарот е одговорен за носење одлука во врска со дијагноза и третман на пациентот и спроведување мерки за контрола на инфекциите во болничката средина (33,34).

Табела 3. Детекција на гени кои кодираат различни типови на бета-лактамази, означени со криви линии во различни бои

tube-n°	Assay parameter (abbreviation in result display)	Specificity	Colour of curve
1	KPC	KPC-2 to -46	red
2	NDM	NDM-1 to -29	orange
3	OXA-48	OXA-48,-162,-163,-199,-204,-244,-245,-247,-252,-370,-405,-416,-438,-439,-505,-515,-517,-519,-538,-566,-567,-793,-918,-920,-929*	yellow
4	VIM	VIM-1 to -6, -8 to -12, -14 to -17, -19, -20, -23 to -46, -48 to -60, -62 to -68, -70 to -72**	light green
5	CTX-M-1-Grp.	CTX-M-1 Group (CTX-M-1,-3, -10, -12, -15, -22 and -23)	dark green
6	CTX-M-9-Grp.	CTX-M-9- Group (CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, -21, -24 and -27)	turquoise
7	Inhibition control	Inhibition control	purple
8	OXA-181	OXA-181,-232,-484,-833,-922,-923,-924	pink

\* OXA-48: OXA-436 and OXA-535 are not detected

\*\* VIM: VIM-7, VIM-13, VIM-18, VIM-47, VIM-61 and VIM-69 are not detected

## 4.6. Статистичка анализа

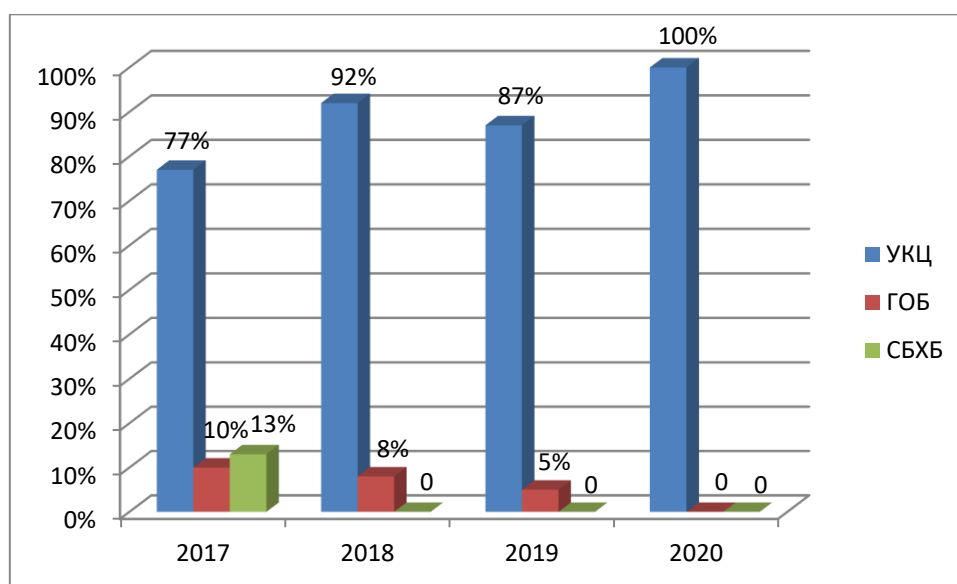
Добиените податоци се анализирани со помош на статистички софтвер IBM SPSS Statistics 21. Резултатите од студијата се прикажани користејќи дескриптивни и непараметриски методи (Pearson Chi square test) во четиригодишниот период (2017-2020). Вредноста на  $p \leq 0.05$  се смета за статистички значајна.

## 5. Резултати

### 5.1. Преваленца и дистрибуција на карбапенем-резистентни соеви на ентеробактерии од хоспитализирани пациенти

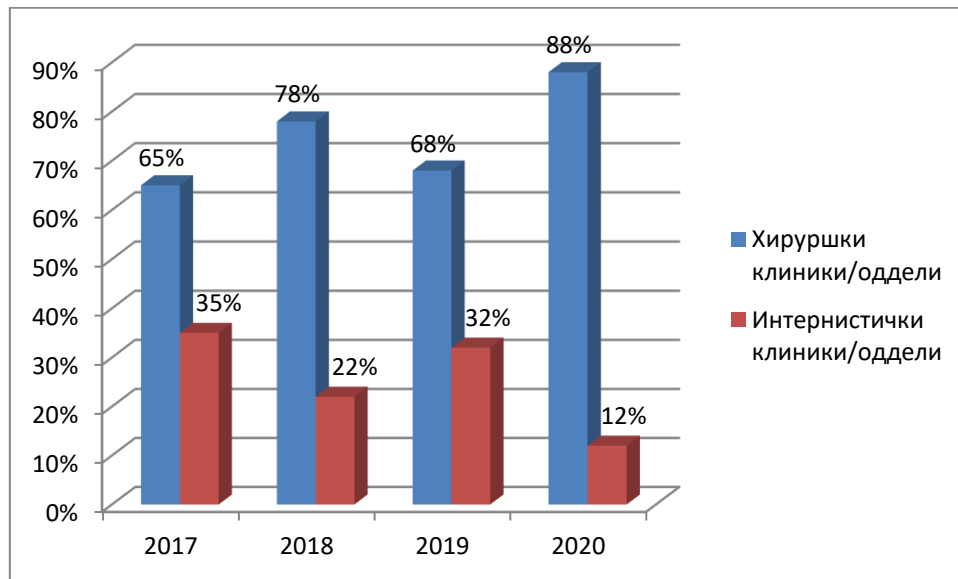
Во 2017 година беа детектирани 49 соеви резистенти на карбапенеми. Овие соеви беа изолирани од 40 пациенти хоспитализирани во Универзитетските клиници во Универзитетскиот клинички центар „Мајка Тереза“ во Скопје - 31 (77%), во Специјалната болница за хируршки болести - 5 (13%) и во Градската општа болница - 4 (10%). Во 2018 година, карбапенем-резистентни изолати беа детектирани во 94 примероци од 60 пациенти. Најголем број од нив 55 (92%) беа хоспитализирани во УКЦ, а 5 (8%) во Градската болница. Во 2019 година, карбапенем-резистентни изолати беа детектирани во 87 примероци од 82 пациенти. Најголем број од нив 71 (87%) беа хоспитализирани во УКЦ, 4 (5%) во ГОБ, додека, пак, 7 (8%) беа амбулантско третирувани пациенти, кои претходно биле хоспитализирани во УКЦ. Во 2020 година, карбапенем-резистентни изолати беа детектирани во 63 примероци од 49 пациенти. Сите пациенти беа хоспитализирани во клиниките при УКЦ.

Може да се примети зголемување на бројот на пациенти со карбапенем резистентни бактерии, и тоа од 40 пациенти во 2017 година, 60 во 2018, па се до 82 пациенти во 2019. Во 2020 година бројот на пациенти изнесуваше 49, што не е реална бројка со оглед на ситуацијата со пандемијата на COVID 19, кога и бројот на пациенти општо беше намален на клиниките во УКЦ.



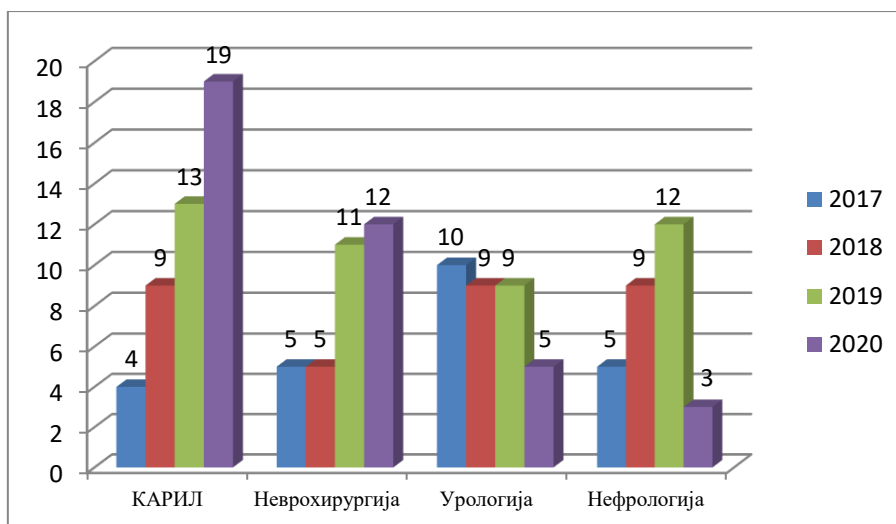
Графикон 1. Приказ на пациенти од кои беа изолирани CRE, хоспитализирани во три здравствени установи

Од графиконот може да се види дека најголем број од пациентите со CRE беа хоспитализирани во клиниките при УКЦ. CRE беа детектирани и кај пациенти хоспитализирани во ГОБ во првите три години, како и во СБХБ, но само во 2017 год. Во 2020 година, CRE беа детектирани само кај пациенти хоспитализирани во клиниките при УКЦ.



Графикон 2. Клиники/оддели во кои беа хоспитализирани пациентите, а од кои беа изолирани CRE

Од графиконот се гледа дека најголем број од пациентите со CRE беа хоспитализирани на хируршките клиники/оддели, речиси двојно повеќе од бројот на пациенти хоспитализирани на интернистичките клиники/оддели. Таа разлика најмногу се забележува во 2020 година. Во сите четири години, таа разлика е статистички значајна ( $p < .05$ ). Во **2017** година, од сите 40 пациенти, 26 (65%) беа хоспитализирани во хируршките клиники/оддели, а 14 (35%) во интернистичките. Во **2018** година, од 60 пациенти, 47 (78%) беа хоспитализирани во хируршките клиники/оддели, а 13 (22%) во интернистичките. Во **2019** година, од 75 хоспитализирани пациенти, 51 (68%) беа хоспитализирани во хируршките клиники/оддели, а 24 (32%) во интернистичките. Во **2020** година 53 (88%) пациенти беа хоспитализирани во хируршките клиники, а 7 (12%) во интернистичките.



Графикон 3. Најчести клиники/оддели во кои беа хоспитализирани пациентите со CRE

Во период од четири години, најмногу пациенти, од кои беа изолирани CRE, беа хоспитализирани на клиниките за урологија, нефрологија (во **2017** година), урологија, кардиохирургија, КАРИЛ и нефрологија (во **2018** година), КАРИЛ, неврохирургија, урологија и нефрологија (во **2019** и во **2020** година).

Во 2017 година, од 49 изолати на CRE, 45 (91,8%) беа изолати на *K. pneumoniae*, а 4 (8,2%) на *Enterobacter cloacae*.

Табела 4. Карбапенем-резистентни изолати од вкупниот број на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* од примероците од кои се изолирани во период од една година (2017)

Примероци	Вкупен бр. на <i>K. pneumoniae</i>	CR- изолати на <i>K. pneumoniae</i>	Вкупен бр. на <i>Enterobacter</i>	CR-изолати на <i>Enterobacter</i>
Урина	89	22 (25%)	/	/
Рана	89	16 (18%)	193	2 (1%)
Хемокултура	7	2 (28,5%)	13	2 (15%)
Тубус/канила	15	3 (20%)	/	/
Спутум/тр. асп	15	2 (13%)	/	/
<b>Вкупно</b>	<b>215</b>	<b>45 (21%)</b>	<b>206</b>	<b>4 (1,9%)</b>

Најголем процент на CR-соєви на *K. pneumoniae* потекнуваа од хемокултура (28,5%), урина (25%) и тубус/канила (20%), додека, пак, кај *Enterobacter spp*, најголем процент на CR-соєви потекнуваа од хемокултура (15%).

Во 2018 година, од 94 изолати на CRE, 69 (73,4%) беа изолати на *K. pneumoniae*, а 25 (26,6%) припаѓаа на видот *Enterobacter cloacae*.

Табела 5. Карбапенем-резистентни изолати од вкупниот број на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* од примероците од кои се изолирани во период од една година (2018)

Примероци	Вк. бр на <i>K. pneumoniae</i>	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i>	Вк. бр на <i>Enterobacter</i>	CR-изолати на <i>Enterobacter</i>
Урина	176	23 (13%)	53	2 (4%)
Рана	73	22 (30%)	73	18 (25%)
Пунктат	29	2 (7%)	26	2 (8%)
Хемокултура	23	7 (30%)	7	1 (14%)
Тубус/канила	12	1 (8%)	4	0
Спутум/тр.асп	61	8 (13%)	17	1 (6%)
Ликвор	5	2 (40%)	1	0
Дрен/катетер	11	2 (22%)	3	1 (33%)
Друго	4	2	14	0
<b>Вкупно</b>	<b>394</b>	<b>69 (17,5%)</b>	<b>198</b>	<b>25 (12,6%)</b>

Во 2018 година се забележува поголем број различни примероци од кои беа изолирани CR-соєви. Најголем процент на CR-соєви на *K. pneumoniae* потекнуваа од хемокултура, рана, ликвор. Кај *Enterobacter spp*, најголем процент на CR-соєви потекнуваа од дрен, рана и хемокултура.



Во 2019 година, од 87 изолати на CRE, 68 (78%) беа изолати на *K. pneumoniae*, 13 (15%) припаѓаа на видот *Enterobacter cloacae*, додека пак, 6 (7%) беа од родовите *Providentia* (3), *E. coli* (1), *Serratia* (1) и *Citrobacter* (1).

Табела 6. Карбапенем-резистентни изолати од вкупниот број на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* од примероците од кои се изолирани во период од една година (2019)

Примероци	Вк. бр на <i>K. pneumoniae</i>	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i>	Вк. Бр на <i>Enterobacter</i>	CR-изолати на <i>Enterobacter</i>
Урина	180	20 (11%)	36	6 (17%)
Рана	60	26 (43%)	65	4 (6%)
Пунктат	28	1 (4%)	16	2 (13%)
Хемокултура	11	4 (36%)	15	1 (7%)
Тубус/канила	22	6 (27%)	5	0
Спутум/тр.асп	43	8 (19%)	22	0
Ликвор	1	1	0	0
Дрен/катетер	6	1 (17%)	11	0
Друго	12	1	0	0
<b>Вкупно</b>	<b>363</b>	<b>68 (18,7%)</b>	<b>170</b>	<b>13 (7,6%)</b>

Во 2019 година, исто како и претходната година, се забележува поголем број различни примероци од кои биле изолирани CR-соєви. Најголем процент на CR-соєви на *K. pneumoniae* потекнуваа од рана, хемокултура, тубус/канила. Кај *Enterobacter spp*, најголем процент на CR-соєви потекнуваа од урина и пунктат.

Во 2020 година, од 63 изолати на CRE, 57 (90,5%) беа изолати на *K. pneumoniae*, 3 (4%) припаѓаа на видот *Enterobacter cloacae*, додека пак, 2 (3,2%) беа од родот *Providentia* и 1 (1,6%) *E. coli*.

Табела 7. Карбапенем-резистентни изолати од вкупниот број на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* од примероците од кои се изолирани во период од една година (2020).

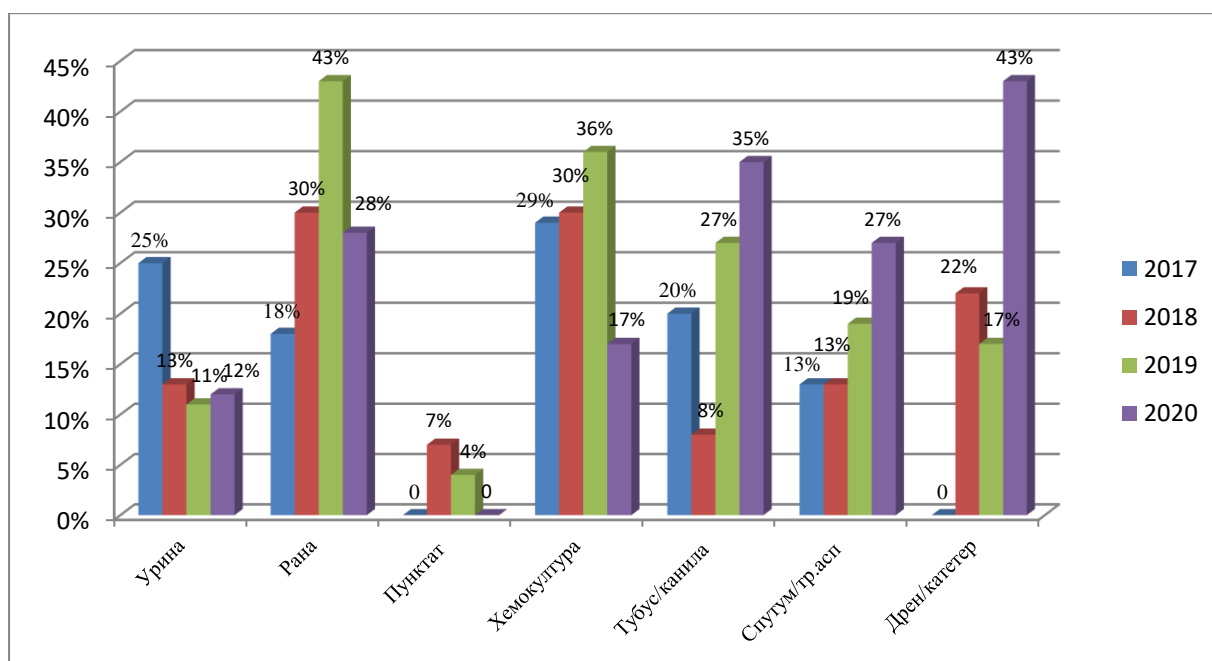
Примероци	Вк. бр. на <i>K. pneumoniae</i>	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i>	Вк. бр на <i>Enterobacter</i>	CR-изолати на <i>Enterobacter</i>
Урина	88	11 (12.5%)	30	
Рана	47	13 (27.7%)	63	3 (4.8%)
Пунктат	21	0	7	
Хемокултура	24	4 (16.7%)	8	
Тубус/канила	23	8 (34.8%)	4	
Спутум/тр.асп	59	16 (27%)	10	
Ликвор	4	2 (50%)	0	
Дрен/катетер	7	3 (43%)	2	
Друго	4	0	2	
<b>Вкупно</b>	<b>277</b>	<b>57 (20.6%)</b>	<b>126</b>	<b>3 (2.4%)</b>

Во 2020 година, исто како и претходните две години, се забележува поголем број различни примероци од кои беа изолирани CR-соєви. Најголем процент на CR-соєви на *K. pneumoniae* потекнуваа од ликвор, дрен/катетер, тубус/канила. Кај *Enterobacter spp*, CR-соєви беа изолирани само од примероци од рана (4,8%).

Ако се сумираат податоците од поединечните табели се добиваат резултати од процентуалната застапеност на CR-изолатите на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* кај различни примероци. Тие податоци се претставени табеларно и графички.

Табела 8. Процент на карбапенем-резистенти (CR) соеви на *Klebsiella pneumoniae* од различни примероци (2017-2020)

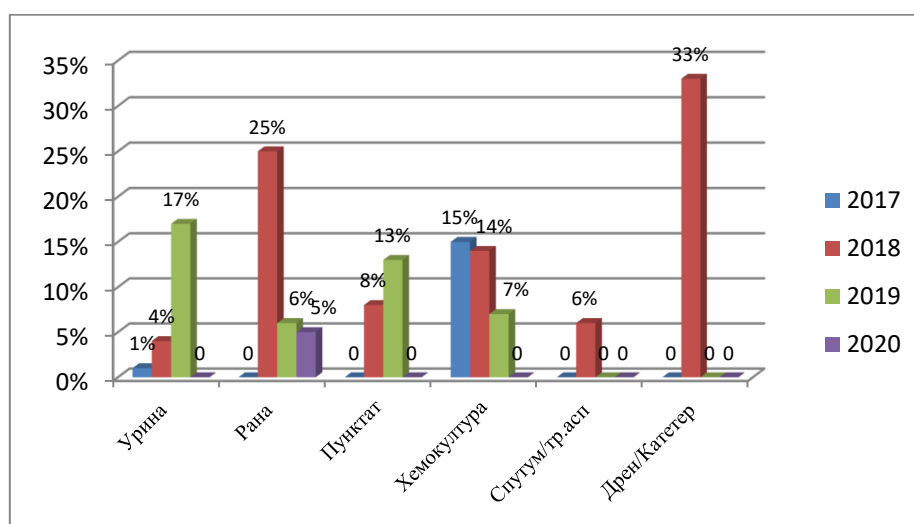
Примероци	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i> 2017	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i> 2018	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i> 2019	CR-изолати на <i>K. pneumoniae</i> 2020
Урина	25%	13%	11%	12%
Рана	18%	30%	43%	28%
Пунктат	0	7%	4%	0
Хемокултура	29%	30%	36%	17%
Тубус/канила	20%	8%	27%	35%
Спутум/тр.асп	13%	13%	19%	27%
Дрен/катетер	0	22%	17%	43%



Графикон 4. Застапеност на карбапенем-резистентите (CR) соеви на *Klebsiella pneumoniae* кај различни примероци (2017-2020)

Табела 9. Процент на карбапенем-резистенти (CR) соеви на *Enterobacter spp* од различни примероци (2017-2020)

Примероци	CR-изолати на <i>Enterobacter</i> 2017	CR-изолати на <i>Enterobacter</i> 2018	CR-изолати на <i>Enterobacter</i> 2019	CR-изолати на <i>Enterobacter</i> 2020
Урина	1%	4%	17%	0
Рана	0	25%	6%	5%
Пунктат	0	8%	13%	0
Хемокултура	15%	14%	7%	0
Спутум/тр.асп	0	6%	0	0
Дрен/Катетер	0	33%	0	0

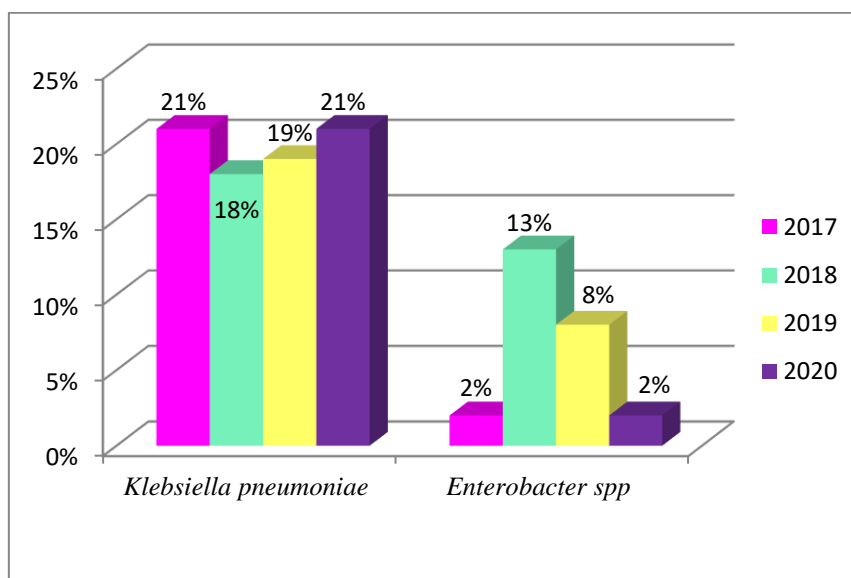


Графикон 5. Застапеност на карбапенем-резистентите (CR) соеви на *Enterobacter spp.* кај различни примероци (2017-2020)

Сумираните податоци за вкупниот процент на CR-изолатите на *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp* за период од 4 години се претставени табеларно (табела 7) и графички (графикон 6).

Табела 10. Процент на резистентни изолати на *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter spp* за период од четири години (2017-2020)

CR- бактерии	2017	2018	2019	2020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21%	18%	19%	21%
<i>Enterobacter spp</i>	2%	13%	8%	2%

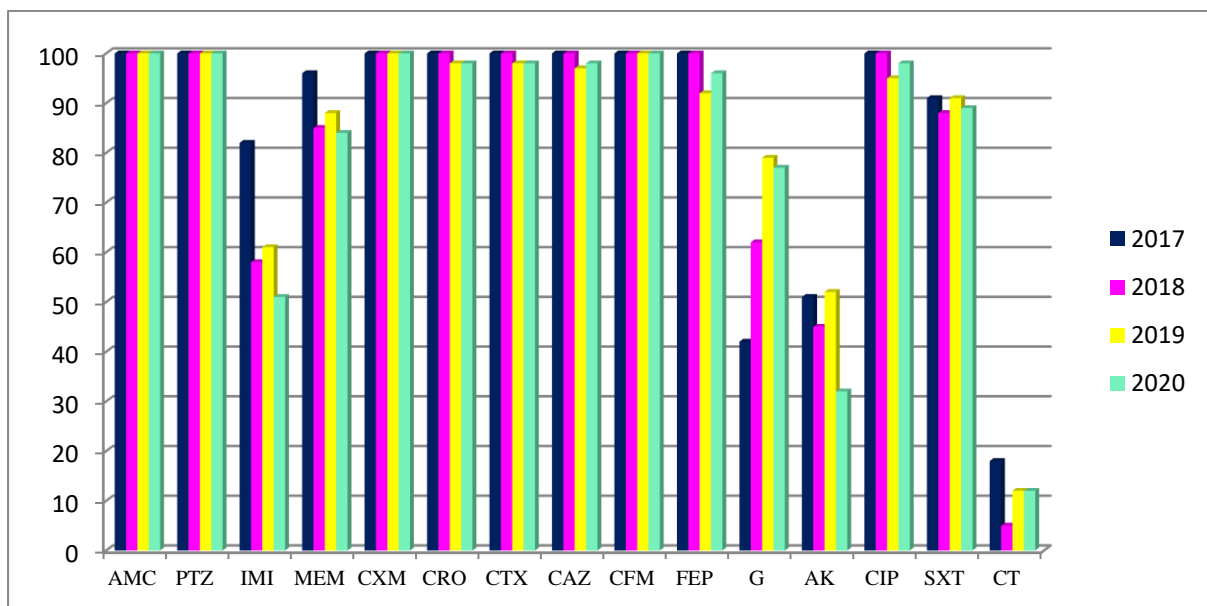


Графикон 6. Процент на резистентни изолати на *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter spp* за период од четири години (2017-2020)

## 5.2. Испитување на осетливоста на карбапенем-резистентните (CR) изолати кон различни групи антимикробни средства

Според EUCAST препораките за испитување на осетливоста на Грам-негативните бактерии од фамилијата *Enterobacterales*, за *in vitro* тестирање се употребени дискови од различни групи антимикробни агенси со диск дифузионен метод.

Резултатите од тоа тестирање се претставени на графикон 7.



**Графикон 7.** Процент на резистенција на карбапенем резистентни соеви на *Klebsiella pneumoniae* за период од четири години (2017-2020)

Кај сите (100%) изолати на *K. pneumoniae* кои продуцираат карбапенемази, беше детектирана резистенција кон следните антибиотици: амоксиклав, пиперацилин/тазобактам, цефуросим, цефиксим во сите четири години.

Резистенција меѓу 90%-99% од соевите на CR- *K. pneumoniae* беше детектирана кон: цефтриаксон, цефотаксим, цефтазидим, цефепим и ципрофлоксацин.

Резистенција меѓу 80-89% од соевите на CR- *K. pneumoniae* беше детектирана кон: меропенем и котримоксазол.

Резистенцијата кон имипенем беше различна во различни години. На пр. во 2017 над 80% од соевите на *K. pneumoniae* беа резистентни кон имипенем, додека, пак, тој процент во 2020 година изнесуваше 50%.

Во однос на аминокликозидите, резистенцијата беше помала кон амикацинолот, споредено со гентамицинолот. Процентот на резистенција кон гентамицинолот се движеше меѓу 40% во 2017 год. до околу 80% во 2019 год. Кај амикацинолот, процентот на резистенција беше помеѓу 30-50%.

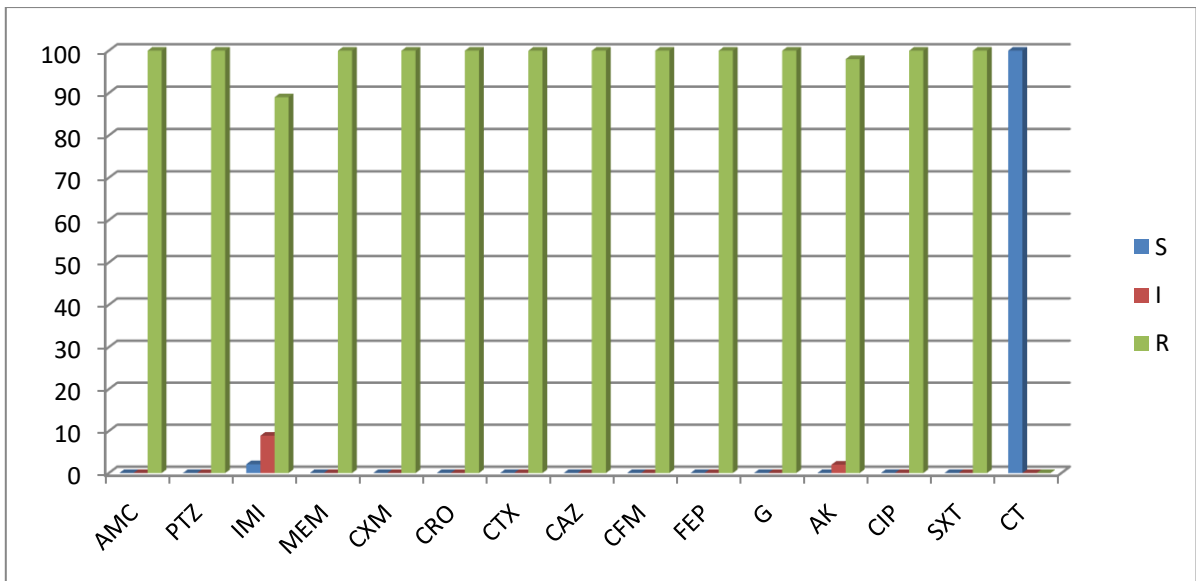
Зголемени вредности на МИК за колистинот беа детектирани кај 8/45 (18%) изолати на *K. pneumoniae* во 2017, 3/69 (4,3%) во 2018, 8/67 (12%) во 2019 и 7/57 (12.3%) во 2020, последователно.



Графикон 8. Процент на резистентни соеви на *K. pneumoniae* кон колистин во период од 4 години (2017-2020)

Кај сите 26 изолати на *K. pneumoniae* беа детектирани високи вредности на МИК за колистин  $\geq 16$  mg/L.

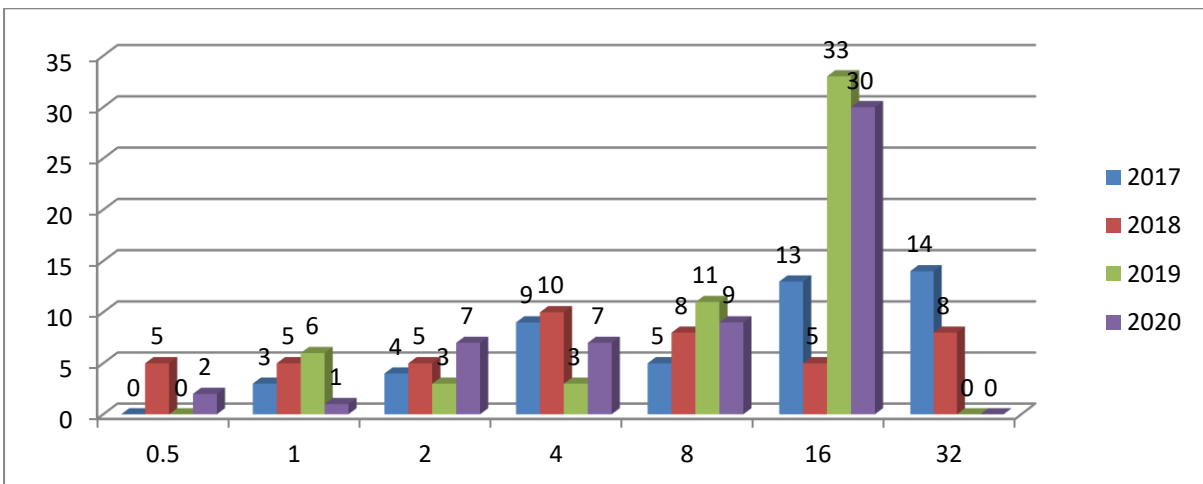
За *Enterobacter spp* претставена е сумирана осетливоста кон различни групи на антимикробни сретства на графикон 9. Сите 45 изолати на CR-соеви на *Enterobacter spp* изолирани во тек на четиригодишниот период беа резистентни на амоксилав, пиперацилин/тазобактам, меропенем, сите испитувани цефалоспорини, гентамицин, ципрофлоксацин и котримоксазол. 89% од соевите беа резистентни на имипенем, а 98% на амикацин. Сите соеви (100%) покажаа осетливост на колистин.



Графикон 9. Процент на резистенција на карбапенем резистентни соеви на *Enterobacter spp.* за период од четири години (2017-2020)

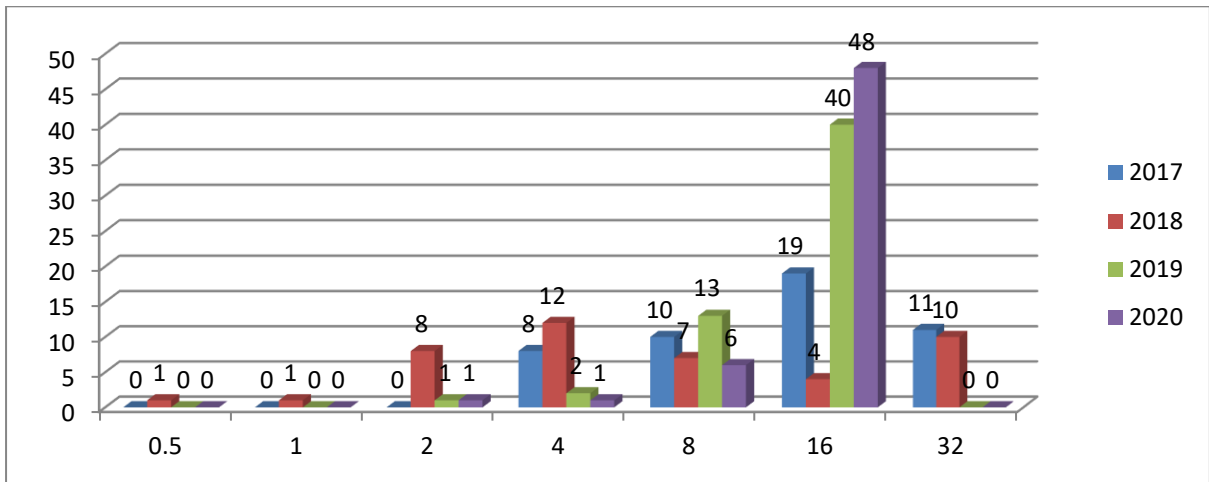
За имипенем и меропенем беа одредени и вредностите на минималните инхибиторни концентрации (МИК), што може да се види од графиконите 10 и 11. Со оглед на тоа што резултатите од испитување на осетливоста на *K. pneumoniae* и на *Enterobacter* беа идентични, претставени се само резултатите од *K. pneumoniae* (заради поголема прегледност).

Иако за период од четири години вредностите на МИК за двата карбапенеми (имипенем и меропенем) се движеа од 2, 4, 6, 8, 16 до 32, сепак најголем број од соевите на *K. pneumoniae* покажаа вредности на МИК од 16 mg/L, што е 8 пати поголема од граничната вредност.



Графикон 9. Вредности на МИК за ИМИПЕНЕМ за изолатите на *Klebsiella pneumoniae* за период од четири години (2017-2020)





Графикон 10. Вредности на МИК за МЕРОПЕНЕМ за изолатите на *Klebsiella pneumoniae* за период од четири години (2017-2020)

### 5.3. Детекција на гените кои кодираат продукција на карбапенемази кај бактерии од фамилијата *Enterobacterales*

Кај сите селектирани изолати (85) кои беа позитивни со фенотипските тестови за детекција на бета-лактамазите, беше применет молекуларниот тест со кој беа детектирани гените за продукција на бета-лактамази.

Кај 75/85 (88,2%) изолати беа детектирани blaNDM гени, и тоа од нив, кај 30/75 (40%) само тие гени, а кај 45/75 (60%) blaNDM-гените беа детектирани заедно со blaCTX-M-1-гените, кои кодираат синтеза на ESBL. Значи, кај нив беше детектирана копродукција на метало-бета лактамази (NDM) и ESBL.

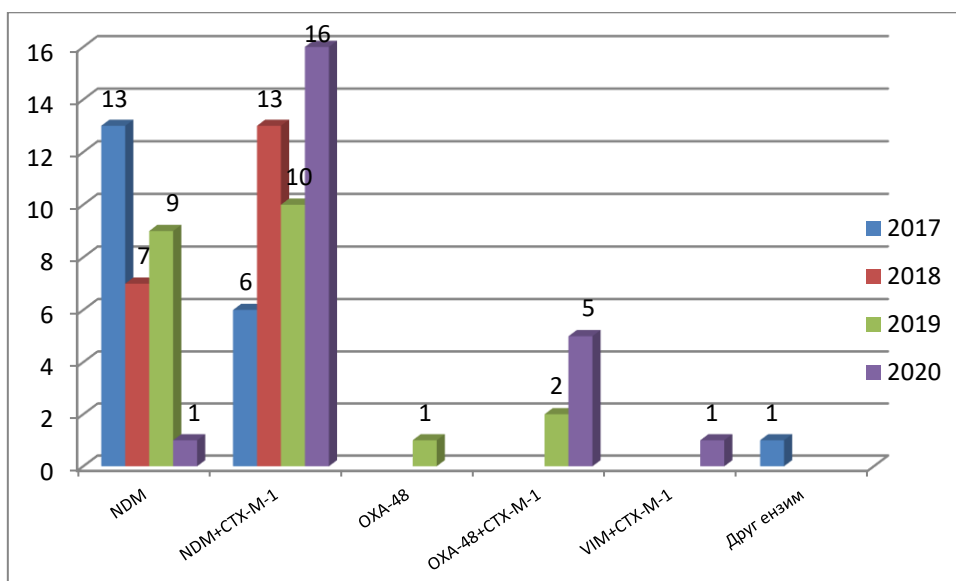
Кај 8/85 (9,4%) од изолатите беа детектирани бета-лактамази од група D, оксацилинази, и тоа, OXA-48. Кај 1/8 изолат (12,5%) бил детектиран само генот blaOXA-48, додека, пак, кај останатите 7/8 (87,5%) blaOXA-48-гените заедно со blaCTX-M-1-гените, кои кодираат синтеза на ESBL. Значи, кај нив е детектирана копродукција на оксацилинази (OXA-48) и ESBL.

Само кај еден изолат (1/85, 1,2%) беше детектирана копродукција на метало-бета лактамази (VIM) и ESBL. Кај тој сој беа детектирани два гени blaVIM и blaCTX-M-1.

Кај еден изолат, кај кој со фенотипски тестови беше докажано присуство на метало-бета лактамази, со Amplex не беа детектирани гени. Се претпоставува дека кај овој изолат присутен е ген кој кодира продукција на друга метало-бета лактамаза, која не е опфатена со тестот.

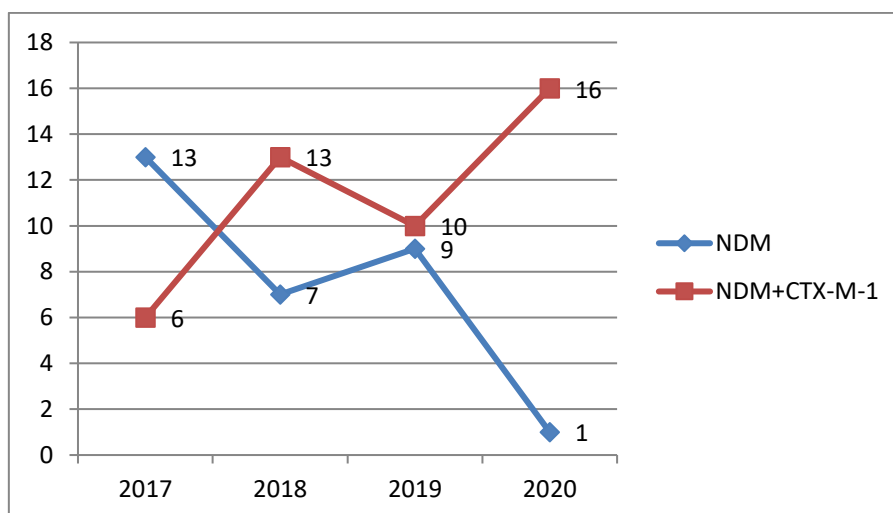
Табела 11. Присуство на гени што кодираат продукција на различни типови на бета-лактамази во период од четири години

	2017	2018	2019	2020	Вкупно	%
NDM	13	7	9	1	30	75 (88,2%)
NDM+CTX-M-1	6	13	10	16	45	
OXA-48			1		1	8 (9,4%)
OXA-48+CTX-M-1			2	5	7	
VIM+CTX-M-1				1	1	1 (1,2%)
Други ензими	1				1	1 (1,2%)



Графикон 11. Присуство на гени што кодираат продукција на различни типови на бета-лактамази во период 2017-2020

Кај најголем број од изолатите беше детектиран ензимот NDM, сам или во комбинација со бета-лактамази од типот CTX-M-1, што припаѓа на ESBL-ензимите. Од графиконот 12 може да се проследи намалување на бројот на изолати кај кои беше детектиран само NDM ензимот во тек на четиригодишниот период, што е сосема обратно од бројот на изолати кои ги содржеа гените за синтеза на двата типа ензими. Бројот на тие изолати во тек на испитуваниот период покажа зголемување.



Графикон 12. Број на изолати што содржеа гени за продукција на NDM или NDM+ESBL во тек на 4 год.

#### 5.4. Споредба на резултатите добиени во тек на испитуваниот четиригодишен период со испитувањето од 2014 година

Табела 12. Споредба на резултатите од актуелниот проект со тие од 2014 год.

	2014	2017	2018	2019	2020
Карбапенем резистентни изолати	<i>Klebsiella</i> 3,17 %	<i>Klebsiella</i> 21% <i>Enterobacter</i> 2%	<i>Klebsiella</i> 18% <i>Enterobacter</i> 13%	<i>Klebsiella</i> 19% <i>Enterobacter</i> 8% *	<i>Klebsiella</i> 20.6% <i>Enterobacter</i> 2.4% * *
Колистин- R	0	18 %	4,3%	12%	12.3%
Типови на карбапенемази	KPC	MBL (NDM)	MBL (NDM)	- MBL (NDM) - Гр. D (OXA)	-MBL (NDM, VIM) - Гр. D (OXA)
Установа каде беа хоспитализирани пациентите со CRE	Универзитетски клинички центар (УКЦ)	- УКЦ - ГОБ - СБХБ	- УКЦ - ГОБ	- УКЦ - ГОБ	- УКЦ

\* Карбапенем-резистентни изолати беа детектирани и кај други членови на фамилијата *Enterobacteriales*, како: *Providentia stuarti* (3 изолати), *E. coli* (1), *Serratia marcescens* (1) и *Citrobacter freundii* (1)

\*\* Карбапенем-резистентни изолати беа детектирани и кај други членови на фамилијата *Enterobacteriales*, како *Providentia stuarti* (2 изолати) и *E. coli* (1)

Од табела 12, може да се види дека во испитуваниот четиригодишен проект не беа детектирани карбапенемази од група А (KPC-ензими). Преваленцата на CRE *K. pneumoniae* се зголеми од 3% на 20%. Беа детектирани резистентни изолати и кај други родови од фам. *Enterobacteriales*, како *Enterobacter*, а во 2019 и во 2020 год и кај *Providentia*, *E. coli*, *Serratia* и *Citrobacter*. Процентот на соеви резистентни на колистин се движеше помеѓу 4,3% и 18%. Доминантни беа типовите на карбапенемази од групата В, како NDM. Бројот на здравствените установи во кои беа хоспитализирани пациентите со CRE, од година во година се намалуваше. Најголем број од пациентите во испитуваниот период беа хоспитализирани во УКЦ.

## 6. Дискусија

### 6.1. Преваленца на карбапенемаза продуцирачки ентеробактерии (CPE)

Преваленцата на CPE, првенствено на *K. pneumoniae*, во повеќе институции во ендемичните области, може да варира помеѓу 20-40%. Примарно, CPE предизвикуваат интрахоспитални инфекции, воглавно во ЕИЛ. Во последно време, тие се проширени и во други болнички оддели (35). Постојат повеќе студии кои укажуваат на факторите кои се поврзани со ризик за ширење на овие соеви во болничка средина, како состојбата на домаќинот, претходна антибиотска терапија, престој во ЕИЛ, трансплантација на органи или стем клетки, присуство на билијарен катетер, хируршка интервенција, присуство на рани итн. (36,37,38). Селективниот притисок од антибиотиците може да биде дополнителен фактор кој влијае на колонизацијата со овие соеви. Постојат студии кои укажуваат дека речиси сите класи на антибиотици може да доведат до селекција на CPE соевите. Она што е важно, е, дека кумулативниот број на претходно дадени антибиотици е поважен отколку специфичната група на антибиотици (39,40,41,42). Еднаш колонизиран интестинален тракт со CPE продуцирачки соеви на ентеробактерии, може да перзистира подолго време. Според некои студии, тоа е повеќе месеци. Оваа пролонгирана колонизација подразбира и поголем резервоар кај колонизираните пациенти и поголема можност за трансмисија од еден на друг пациент (43).

Брзото ширење на карбапенемаза-продуцирачките ентеробактерии (CPE) претставува глобална закана за сигурноста на пациентите и за здравствениот систем. Додека податоците за инвазивни изолати добиени од European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) покажуваат стабилни пропорции на карбапенем резистентни соеви на *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* за последните 4 години во Европската Унија/Европската економска заедница како целина, сепак детектирана е хетерогеност меѓу земјите, со преваленца на CPE инвазивните изолати на *K. pneumoniae* од 0 до 65% во 2017. Во 2017 год., Европскиот центар за контрола и превенција на болестите (the European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC) воспостави една мрежа (the European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network-EURGen-Net) за спроведување проект за карбапенем и/или колистин резистентни соеви на *Enterobacteriaceae* (CCRE) во Европа (44). Во 2018, сите 37 земји-учеснички во проектот пријавиле соеви на CPE, додека, пак, во 2015 год. три

земји не пријавиле ниту еден изолат на CRE (45). Единаесет земји пријавиле повисоко епидемиолошко ниво на CRE (46). Споредено со 2015 година, бројот на земји со регионално или интеррегионално ширење се проширил на 16. Истите 4 држави (Грција, Италија, Малта и Турција), како и во 2015 година, пријавиле ендемска ситуација и во 2018 година. Во првиот проект во кој учествуваше и нашата земја, за период од една година (2013-2014), од вкупно 252 изолати на *Klebsiella pneumoniae* изолирани од сите примероци на Институтот, само 8 (3,14%) беа резистентни на карбапенемите. На мапата на Европа, нашата земја, во 2015 год. беше обоена светло сино, што значи епидемиолошко ниво 1 (спорадично појавување), додека, пак, во 2018 година, по пријавувањето на поголем број CR-изолати на *K. pneumoniae*, на картата на Европа, нашата држава стана жолто обоена, што означува епидемиолошко ниво 2a (хоспитална епидемија) (single hospital outbreak) (25).

Од појавата на карбапенем-резистентни изолати на ентеробактерии, процентот на овие изолати се зголеми од 3% во 2014 година, кога овие соеви се појавија спорадично, до 20% во 2017 година, откако почнаа овие соеви континуирано да се детектираат во рутинската работа. Причините за тоа се повеќебројни. Прво, во изминатите десетина години се појавија соеви на *E. coli* и *K. pneumoniae* кои продуцираат бета-лактамази со проширен спектар (ESBL), кои ги инактивираат природните пеницилини, прво и второ - генерациските цефалоспорини, како и новите групи на цефалоспорини (оксиимино-цефалоспорини) и монобактамите. Овие ензими не делуваат и не ги инактивираат цефамицините (cefoxitin, cefotetan) и карбапенемите (imipenem, meropenem). Бидејќи ESBL се кодирани од гени кои се лоцирани на плазмидите, тие многу брзо и лесно може да се пренесат меѓу различни родови од фамилијата ентеробактерии, што особено се случува во дигестивниот тракт, каде овие бактерии се наоѓаат во голем број. Многу фактори во болничката средина го овозможуваат ширењето на овие соеви. Бидејќи се работи за резистентни изолати, карбапенемите се даваат како лекови од избор во лекување на инфекциите предизвикани со овие соеви. Токму заради селективниот притисок кој се јавува со употребата на оваа класа на антимикуробни агенси, бактериите многу бргу по нивната примена развиле повеќе механизми на резистенција, од кој најчесто е способноста на бактериите да продуцираат ензими (карбапенемази), кои го разградуваат карбапенемот. Второ, во втората половина на 2017 година во сите микробиолошки лаборатории почнаа да се применуваат EUCAST-критериумите за интерпретација на

антибиограмите, според кои вредностите на зоната на инхибиција на раст околу дисковите со карбапенеми (меропенем, имипенем и ертапенем) се зголемени (од 13-16 на 22-25). Според тоа голем број соеви кои според претходните CLSI-критериуми биле осетливи, сега се селектираат како резистентни и токму на тие соеви се применија сите фенотипски методи со цел да се детектира механизмот на резистенција (дали е ензимски или комбиниран). Голем број од тие соеви продуцираа карбапенемази.

По анализа на сите податоци добиени во изминатиот четиригодишен период, може да се забележи зголемување на бројот на пациенти од кои беа изолирани CRE, од 40 во 2017, 60 во 2018, па се до 82 пациенти во 2019. Во 2020 година бројот на пациенти беше 49, што не е реална бројка со оглед на ситуацијата со пандемијата на COVID 19, кога и бројот на хоспитализирани пациенти општо беше намален и на клиниките при УКЦ, како и во другите здравствени установи.

Најголем број од пациентите со CRE беа хоспитализирани во клиниките при УКЦ, и тоа на хируршките клиници, речиси двојно повеќе од бројот на пациенти хоспитализирани на интернистичките клиници. Таа разлика најмногу се забележува во 2020 година, кога 88% од пациентите беа хоспитализирани во хируршките клиници, а 12% во интернистичките. Најголем број пациенти, од кои беа изолирани CRE, беа хоспитализирани на клиниките за урологија и нефрологија (во 2017 година), урологија, кардиохирургија, КАРИЛ и нефрологија (во 2018 година), КАРИЛ, клиниката за неврохирургија, урологија и нефрологија (во 2019 и во 2020 година). Овие податоци се во согласност со студиите во кои се детектираат факторите поврзани со ризикот од ширење на овие соеви во болничка средина, што се поприсутни во хируршките оддели.

Преваленцата на *K. pneumoniae* беше меѓу 18-21%. Во однос на примероците, во испитуваниот период, преваленцата на *K. pneumoniae* од урина беше од 11-25%, од рана -18-43%, од хемокултура-17-36%, од тубус/канила-8-35%, од спутум/трахеален аспират-13-27% и од дрен/катетер-0-43%.

Преваленцата на *Enterobacter spp.* беше меѓу 2-13%. Во однос на примероците, во испитуваниот период, преваленцата на *Enterobacter spp.* од урина беше од 0-17%, од рана од 0-25% и од хемокултура од 0-15%. Овие податоци се во согласност со објавената и погоре посочена литература.

## **6.2. Осетливост на соевите на *K. pneumoniae* и други ентеробактерии што продуцираат карбапенемази кон различни групи антимикробни агенси**

Бактериите што продуцираат КРС стануваат резистентни на пеницилини, карбапенеми, цефалоспорини, цефамицини и монобактами, а може да бидат инхибирани со клавуланска киселина, тазобактам, борна киселина и авибактам. Бактериите што продуцираат метало-бета лактамази покажуваат резистенција на пеницилини, карбапенеми, цефалоспорини и цефамицини, но се осетливи на монобактами, а нивната активност се инхибира со метални хелатори како EDTA и дипиколинска киселина. Повеќето бактерии, продуценти на NDM-1 поседуваат дополнителни механизми на резистенција кон антимикробни агенси (47). Тие вклучуваат: плазмидска бета-лактамаза (AmpC  $\beta$ -лактамаза), ESBLs (посебно продукција на CTX-M), различни карбапенемази (на пр. OXA-48, VIM и KPC-типовите), 16S rRNA метилтрансферази, кинолон-резистентни детерминанти лоцирани на плазмидите, макролиди-модифицирачки естерази и рифампин-модифицирачки ензими. OXA-48 ефикасно ги хидролизира бета-лактамите со тесен спектар како пеницилините, слабо ги хидролизира карбапенемите, а ги поштедува цефалоспорините со широк спектар. Бактериите што продуцираат OXA-48-ензими можат да покажат осетливост кон цефалоспорините со поширок спектар во 20% од случаите (48,49,50).

Од сето ова може да се заклучи дека Грам-негативните бактерии кои продуцираат карбапенемази се резистентни кон речиси сите бета-лактами и често пати истовремено поседуваат и механизми на резистенција кон други групи антимикробни агенси, како флуорокинолони и/или аминокликозиди. Затоа, постарите агенси, како полимиксини или фосфомицин кои во минатото поретко биле употребувани заради нивната послаба ефикасност или токсичност, заедно со поновиот тигециклин, стануваат последна опција за терапија. Карбапенемите, и покрај тоа што се хидролизираат со карбапенемазите (од таму всушност произлегува името на ензимите), сепак може да задржат нешто од својата активност кон карбапенемаза-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae* (51,52). Врз основа на антибиограмите, клиничарите би требало да одлучат помеѓу една од следните опции: а) монотерапија со употреба на еден сеуште *in vitro* активен агенс (колистин, гентамицин, тигециклин и фосфомицин), б) комбинирана терапија без карбапенем или б) комбинирана терапија со два или повеќе



лекови, што вклучува барем еден карбапенем, во случај неговата МИК да е  $\leq 4$  mg/L (последнава опција се чини најефективна во намалување на морталитетот) (52).

Колистин (polymyxin E) бил откриен пред повеќе од 60 години. Главен несакан ефект е нефротоксичност, а оптималното дозирање не е познато. Колистинот се наметна како многу атрактивна опција во третман на инфекциите со бактерии што продуцираат карбапенемази. Во случаи кога се употребувал како монотерапија при сериозни инфекции, бил поврзан со смртност над 50% (53,54). Во поновите студии базирани на фармакокинетиката на колистинот, се укажува на употребата на колистинот во повисоки дози од тие употребени во претходните студии (55). Колистинот има значителна активност кон различни карбапенемаза-продуцирачки соеви и често се употребува во комбинирана терапија (на пр. со аминогликозиди, азтреонам, карбапенеми, рифампин, тигециклин или фосфомицин). Но, за жал, зголемената употреба на колистинот, доведува до појава на колистин-резистентни соеви на *K pneumoniae* (56).

In vitro анализите покажале синергистичка активност на колистин и фосфомицин кон некои продуценти на NDM. Интравенски применет фосфомицин, кој е достапен во Европа, во комбинација со тигециклин и колистин, може да се употреби во терапија на инфекции со мултирезистентни бактерии (57).

Тигециклинот е тетрациклински дериват и е достапен од 2005 год. Не дифундира доволно во уринарниот тракт, од каде потекнуваат многу инфекции со карбапенемаза-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae*. In 2013, FDA објави предупредување од зголемен ризик од смртност при употреба на тигециклинот (2.5%) во споредба со друг антибиотик (1.8%) што е поврзано со терапевски неуспех (58). Исто така, стекната резистенција кон тигециклин е детектирана кај пациенти инфицирани со КРС-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae*. Поновите студии укажуваат на подобар ефект при повисоки дози, споредено со употребата на конвенционалното дозирање (59).

Во однос на рифампинот, неколку студии укажуваат на синергистичкиот ефект меѓу рифампинот и тигециклинот или колистинот за убивање на карбапенемаза-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae* (60). Но, сеуште недостасуваат клинички податоци за рутинска употреба на рифампин во терапија на инфекции со СР- *K. pneumoniae*.

Некои продуценти на КРС и ОХА-48 покажуваат осетливост кон гентамицин, но тоа е ретко кај продуцентите на NDM. Аминогликозидите се употребуваат со клинички успех или како монотерапија или како комбинирана терапија во третман на инфекции предизвикани со КРС-продуценти. Понови студии укажуваат на подобар успех кога се употребува гентамицин (како монотерапија или во комбинација со тигецилин) кај колистин-резистентен, КРС-продуцирачки сој на *K. pneumoniae*. Несакан ефект на аминогликозидите е нефротоксичност, особено изразена во комбинација со колистин (61).

Во последно време, еден од најветувачките лекови е комбинацијата на авибактам со цефтазидим (62). Употребата на оваа комбинација може да е од големо значење во третман и контрола на инфекциите со соеви на *K. pneumoniae* што продуцираат КРС или ОХА-48-ензими. Како и да е, останува да се работи на наоѓање ефикасен третман на инфекциите предизвикани со MBL-продуценти (на пр. VIM, IMP и NDM) (63,64).

Резултатите од нашата студија во однос на резистенцијата, се во корелација со други објавени студии. Сите CR-соеви на *K. pneumoniae* беа резистентни кон следните антибиотици: амоксиклав, пиперацилин/тазобактам, цефуроксим, цефиксим во сите четири години. Резистенција меѓу 90%-99% од соевите на CR-*K. pneumoniae* беше детектирана кон: цефтриаксон, цефотаксим, цефтазидим, цефепим и ципрофлоксацин. Резистенција меѓу 80-89% од соевите на CR-*K. pneumoniae* беше детектирана кон: меропенем и котримоксазол. Иако процентот на резистентни соеви на *K. pneumoniae* кон имипенем во 2020 год. изнесуваше 50%, сепак овој антибиотик не може да се употреби како монотерапија. Според објавените податоци, употребата е можна само во комбинација со други антибиотици, само ако МИК на имипенем е  $\leq 4$  mg/L. Во нашата студија, за период од четири години, вредностите на МИК за двата карбапенеми (имипенем и меропенем) се движеа од 2, 4, 6, 8, 16 до 32, но, сепак, најголем број од соевите на *K. pneumoniae* покажаа вредности на МИК од 32 mg/L, што е 8 пати поголема од граничната вредност. Во однос на аминогликозидите, резистенцијата беше помала кон амикацинот, споредено со гентамицинот. Процентот на резистенција кон гентамицинот се движеше меѓу 40% во 2017 год до околу 80% во 2019 год. Кај амикацинот, процентот на резистенција беше помеѓу 30-50%. Аминогликозидите, како што е погоре објаснето, може да се употребат како монотерапија, но почесто и како комбинирана терапија, кај соеви што продуцираат КРС. Во нашите болници,

колистинот е лек од избор во терапија на инфекциите со СРЕ. Она што загрижува е појавата на резистенција кон колистин. Во нашата студија беа детектирани 26 изолати на *K. pneumoniae* резистентни на колистин, со многу високи вредности на МИК, кои изнесуваа  $\geq 16$  mg/L.

### **6.3. Глобално ширење на различните типови на карбапенемази**

#### **Продуценти на КРС-типовите на ензими**

Брзата дисеминација на КРС-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae* прв пат била детектирана во северо-источните делови од САД во тек на првата деценија од 21 век (65). Според едно, најмногу прифатено сценарио, најважен момент бил преносот на овие соеви од САД во Израел, а од таму во најблиските земји од соседството, а потоа преку Грција до другите европски земји (66). Во Грција, овие соеви станале доминантни во терциерните болници, добивајќи епидемски размери само во период од две години. Во Северно и Западно европските земји преваленцата на КРС останува ниска, освен спорадично пријавување на овие изолати од пациенти кои патувале во високопревалентни области (67). КРС-продуценти се детектирани и кај други родови од фамилијата на ентеробактерии, како *E. coli* и *Enterobacter cloacae*, и тоа во области каде што преваленцата на КРС-позитивни соеви на *K. pneumoniae* е висока (67).

Во период од една година (2013-2014), од вкупно 252 изолати на *Klebsiella pneumoniae* изолирани од сите примероци на Институтот, само 8 (3,14%) беа резистентни на карбапенеми. Тие беа изолирани од 3 пациенти, хоспитализирани во УКИЦ. Кај овие изолати, со примена на молекуларни методи (PCR), беа детектирани гени кои кодираа бета-лактамази од класата А, односно КРС бета-лактамази. Од тогаш не се детектирани КРС типови на ензими кај изолати на ентеробактерии. Тие изолати не се вклучени во овој проект.

#### **Продуценти на метало-бета лактамази (MBL)**

Соеви на *K. pneumoniae* може да продуцираат ензими кои припаѓаат на некоја од трите фамилии на MBL (VIM, IMP и NDM). Иако нивното ширење достигнува интернационално ниво, сепак постојат значајни локални разлики. VIM-позитивни соеви на *K. pneumoniae* прв пат биле детектирани во периодот од 2001 до 2003 во

Јужна Европа, а потоа биле проширени во Северна Европа и САД, најмногу преку колонизирани пациенти кои патувале од високо превалентни земји (68). Досега, VIM-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae* и други ентеробактерии почесто се изолирани во медитеранските земји, достигнувајќи епидемски размери само во Грција (69). Стекнувањето на IMP метало-бета лактамази кај *K. pneumoniae* било опишано во тек на 1990 година, најпрво во Јапонија, а потоа и во Тајван и Сингапур. Тие сеуште остануваат најчести ензими во Јапонија (70). Изолати на *E. coli* и *K. pneumoniae* продуцираат и NDM, најскоро идентификувани метало-бета лактамази. Епицентарот на епидемијата со овие соеви е Индискиот подконтинент, каде што се детектирани во хоспиталните средини, како и нивно екстензивно ширење во околината (71). Овие гени (*bla*NDM) се прошируваат и кај други родови од фамилијата ентеробактерии. Ширењето на овие соеви во Западно европските земји, Северна Америка, Австралија и Далечниот Исток се поврзува со пациенти кои потекнуваат од Индија, Пакистан и Бангладеш (72). Карактеристика за соевите на *K. pneumoniae* што продуцираат NDM е нивната брза дисеминација, а она што загрожува е дека се јавуваат кај инфицирани или колонизирани пациенти без конекција со Индискиот подконтинент и токму тие се почесто се пријавуваат во повеќе земји (73).

Првите соеви кај кои е детектирана продукцијата на NDM на Институтот за микробиологија се откриени во јануари 2017 год. Од тој период, се до крајот на 2020 година, сите изолати кај кои е детектирана продукција на карбапенемази, се опфатени во овој проект. Кај 75/85 (88,2%) изолатите беа детектирани *bla*NDM гените, и тоа од нив, кај 30/75 (40%) само тие гени, а кај 45/75 (60%) *bla*NDM-гените заедно со *bla*CTX-M-1-гените, кои кодираат синтеза на ESBL. Значи, кај нив е детектирана копродукција на метало-бета лактамази (NDM) и ESBL. Само кај еден изолат (1/85, 1,2%) беше детектирана копродукција на метало-бета лактамази (VIM) и ESBL. Кај тој сој беа детектирани два гени *bla*VIM и *bla*CTX-M-1. Кај еден изолат, кај кој со фенотипски тестови беше докажано присуство на метало-бета лактамази, со Amplex не беа детектирани гени. Се претпоставува дека кај овој изолат е присутен ген кој кодира продукција на друга метало-бета лактамаза, која не е опфатена во тестот.

### **Продуценти на OXA-48**

OXA-48-продуцирачки соеви на *K. pneumoniae* биле прв пат детектирани во Турција, во 2001 год. (74). Речиси во исто време, овие соеви биле детектирани и во

Источно и Северно африкански земји, како и во некои Западно европски земји, вклучувајќи ги Велика Британија, Белгија, Франција, Германија и Холандија. Во овие земји соевите биле детектирани кај колонизирани пациенти од северна Африка (69). Појавата на овие ензими и кај други бактериски видови укажува на нивниот потенцијал за ширење на гените *bla<sub>OXA-48</sub>* (75).

Во нашата студија, кај 8/85 (9,4%) од изолатите беа детектирани бета-лактамази од група D, оксацилинази, и тоа, OXA-48. Кај 1/8 изолат (12,5%) беше детектиран само генот *bla<sub>OXA-48</sub>*, додека, пак, кај останатите 7/8 (87,5%) *bla<sub>OXA-48</sub>*-гените беа заедно со *bla<sub>CTX-M-1</sub>*-гените, кои кодираат синтеза на ESBL. Значи, кај нив беше детектирана копродукција на оксацилинази (OXA-48) и ESBL.

## 7. Заклучоци

Процентот на карбапенем-резистентни изолати на ентеробактерии, од 3% во 2014 година, кога овие соеви се појавија спорадично, се зголеми на 20% во 2017 година, откако овие соеви почнаа континуирано да се детектираат во рутинската работа. Бројот на пациенти од кои беа изолирани CRE се зголемуваше од година во година, од 40 во 2017, 60 во 2018, па се до 82 пациенти во 2019. Во 2020 година бројот на пациенти беше 49, што не беше реална бројка, со оглед на ситуацијата со пандемијата на COVID 19, кога и бројот на хоспитализирани пациенти општо беше намален и на клиниките при УКЦ, како и во другите здравствени установи. Најголем број од пациентите со CRE беа хоспитализирани во клиниките при УКЦ, и тоа на хируршките клиници, речиси двојно повеќе од бројот на пациенти хоспитализирани на интернистичките клиници. Тоа се поврзува со факторите кои го зголемуваат ризикот од ширење на овие соеви во болничка средина, што се поприсутни во хируршките оддели. Преваленцата на *K. pneumoniae* беше меѓу 18-21%, а на *Enterobacter spp.* беше меѓу 2-13%.

Особено значајно е што карбапенем-резистентните изолати на ентеробактерии покажуваат резистенција кон повеќе групи антимикробни средства и има многу мал број опции за третман на инфекциите предизвикани со овие мултирезистентни соеви. Оптимален третман кај овие инфекции не е познат и ниту еден од постоечките антибиотици употребен како монотерапија (single therapy) може да биде ефективен за третман на инфекциите предизвикани од бактерии што ги продуцираат сите типови на карбапенемази. Во нашата средина како лек од избор се употребува колистинот. Прашање на време е кога овие соеви ќе станат резистентни и на колистин (веќе има појава на повеќе такви изолати). Значајно е и ширењето на гените кои кодираат карбапенемази и на други родови од фам. *Enterobacterales*, што беше детектирано и во нашата студија.

Детектирањето на гените кои кодираат различни типови карбапенемази е особено значајно од епидемиолошки аспект, за да се види дали во сите болнички средини е присутен еден или повеќе типови на ензими, дали тие потекнуваат од еден или повеќе пациенти и слично, за да може да се превземат мерки за контрола на ширењето на овие соеви во болничката средина. Кај најголем број од изолатите беше

детектирана копродукција на метало-бета лактамази (NDM) и ESBL, како и копродукција на оксацилинази (OXA-48) и ESBL.

Врз основа на резултатите добиени од оваа студија се добија сознанија за процентот на застапеност на карбапенем-резистентните изолати во болничките средини, механизмите на резистенција, како и нивната осетливост кон антимикуробни средства. Можноста за детекција на овие соеви во микробиолошките лаборатории овозможува примена на мерки за контрола и намалување на ширењето на карбапенем-резистентните соеви во болничките средини, со цел да се намали бројот на животозагрозувачки инфекции предизвикани од овие соеви, за кои опциите за третман се сведени на минимум.

## 8. Литература

1. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*. 2003;36(1):S11-23.
2. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015;5(1):21.
3. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med*. 2012;18(5):263–72.
4. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;4(2):107–18.
5. Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends*. 2016;10(1):14–21.
6. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15–21.
7. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943–60.
8. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect*. 2014;44(2):51–6.
9. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):1-20.
10. Sahuquillo-Arce JM, Hernández-Cabezas A, Yarad Auad F, Ibáñez-Martínez E, Falomir-Salcedo P, Ruiz-Gaitán A. Carbapenemases: A worldwide threat to antimicrobial therapy. *World J Pharmacol*. 2015;4(1): 75-95.
11. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
12. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(7):1597-1606.
13. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, Belder DD, Rapoport M, Gatti B, Petroni A, CorsoGomes S. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(5):E233-5.
14. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Fernández-García MD, Delgado-Iribarren A, Sánchez-Romero I, García-Picazo L, Miguel MD, Solís S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):317-21.
15. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151-61.
16. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228–36.
17. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol. Rev*. 2005;18(2):306–25.
18. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol*. 2011;6(3):317–33.
19. Zhao W-H, Hu Z-Q. IMP-type metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37(3):214–26.
20. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) - mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol*. 2013;62(4):499–513.
21. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(6):321–31.



22. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):355–62.
23. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24–38.
24. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D betalactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2119–25.
25. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, and the EUSCAPE-working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: Assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015; (20)45:1-18.
26. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory detection and clinical implication of oxacillinase-48 like carbapenemase: the hidden threat. *J Glob Infect Dis*. 2016; 8(1):41–50.
27. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 1.0, 2013. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).
28. Van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram Negative Rods. *PLoS ONE* 2015;10(3): e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690
29. Wonkeun S, Han-Sung K, Jae-Seok K, Hyun Soo K, Dong Hoon S, Saeam S, Min-Jeong P. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* *Ann Clin Microbiol* 2016;19(4):83-87.
30. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church D, Pitouta D. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012;50 (12): 3877–80.
31. Marva Said A. Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase and New Delhi metallo-beta-lactamase in Behna University Hospitals. *EJMM* 2016; 25(3):19-24.
32. <http://www.hyplex.de>
33. Garcia-Fernandez S, Morosini M, Marco F, Gijon D, Vergara A, Vila J, Ruiz-Garbajosa P, Canton R. Evaluation of the eazyplex SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):1047-50.
34. Escriva BF, Garcia CS, Palop NT, Cardona CG. Easyplex SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemase and extended spectrum beta-lactamase genes in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 (4):1-3.
35. Tsouvelekis LS, Markogiannakis A, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(4):682-707.
36. Daikos GL, Vryonis E, Psychogiou M, Tzouvelekis LS, Liatis S, Petrikkos P, Kosmidis C, Tassios PT, Bamias G, Skoutelis A. Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):784-8.
37. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(12):1180-5.
38. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1028-1033.
39. Jeon MH, Choi SH, Kwak YG, Chung JW, Lee SO, Jeong JY, Woo JH, Kim YS. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Escherichia coli* among hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(4):402-6.

40. Kassis-Chikhani N, et al. Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a liver transplant centre in France, 2003–2004. *Euro Surveill.* 2010; 15:19713. [http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId\\_19713](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId_19713)
41. Patel G, Perez F, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*: assessing their impact on organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2010. doi:10.1097/MOT.0b013e3283404373.
42. Patel N, Harrington S, Dihmess A, Woo B, Masoud R, Martis P, Fiorenza M, Graffunder E, Evans A, McNutt LA, Lodise TP. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or -resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1600-8.
43. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. *JAMA* 2008; 300(24):2911–3.
44. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, Kohlenberg A, European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) capacity survey group. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(9):pii=1900123.
45. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45):30062.
46. Pirš M, Cerar Kišek T, Križan Hergouth V, Seme K, Mueller Premru M, Jeverica S, Logar M, Mrvič T, Žnidaršič B, Jordan Markočič O, Lejko Zupanc T. Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia 2014–2016. *J Hosp Infect.* 2019;101(2):142-149.
47. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8.
48. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol. Infect* 2014;20(9):821–30.
49. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012;18(5):263–72.
50. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59(10):5873-84.
51. Gonzalez-Padilla M, Torre-Cisneros J, Rivera-Espinar F, Pontes-Moreno A, López-Cerero L, Pascual A, Natera C, Rodríguez M, Salcedo I, Rodríguez-López F, Rivero A, Rodríguez-Baño J. Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(3):905–13.
52. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, Stefanou I, Sypsa V, Miriagou V, Nepka M, Georgiadou S, Markogiannakis A, Goukos D, Skoutelis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(4):2322–28.
53. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(10):1351–70.
54. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501–12.
55. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, Silveira FP, Forrest A, Nation RL. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3284–94.
56. Mamma C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, Saporito MA, Verde MS, Tetamo R, Palma DM. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.*

57. Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2011;66(10):2295–7.
58. Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. Ann N Y. Acad Sci.2014;1323:22–42.
59. De Pascale G, Montini L, Pennisi M, Bernini V, Maviglia R, Bello G, Spanu T, Tumbarello M, Antonelli M. High dose tigecycline in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria. Crit Care 2014;18:R90. <http://dx.doi.org/10.1186/cc13858>.
60. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerback P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1757–62.
61. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2014;20:862–872.
62. Martirosov DM, Lodise TP. Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85(2):266-75.
63. Mimoz O, Gregoire N, Poirel L, Marliat M, Couet W, Nordmann P. Broad-spectrum beta-lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(5):2759–60.
64. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):15-21.
65. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):3018-20.
66. Wernli D, Hausteiner T, Conly J, Carmeli Y, Kickbusch I, Harbarth S. A Call for Action: The Application of the International Health Regulations to the Global Threat of Antimicrobial Resistance. PLoS Med.2011;8(4): e1001022. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001022>
67. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2008;62(6):1261-4.
68. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta lactamases: a last frontier for beta-lactams? Lancet Infect. Dis. 2011;11(5):381–93.
69. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro Surveill. 2010;15(46):19711.
70. Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, Yamaguchi K. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. Int J Antimicrob Agents. 2007;29(3):306-10.
71. Kumarasamy KK, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2010; 10(9):597– 602.
72. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):689–92.
73. Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. J Antimicrob Chemother. 2011;66(12):2781–2783.
74. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):15–22.
75. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):1369-73.

