

# Kolonizacija usne šupljine multirezistentnim gram-negativnim bakterijama kao rizični čimbenik za razvoj ventilatorom prouzročene upale pluća

---

**Bratić, Vesna**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:247230>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Vesna Bratić

**KOLONIZACIJA USNE ŠUPLJINE  
MULTIREZISTENTNIM GRAM-NEGATIVNIM  
BAKTERIJAMA KAO RIZIČNI ČIMBENIK ZA  
RAZVOJ VENTILATOROM PROUZROČENE  
UPALE PLUĆA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Vesna Bratić

**KOLONIZACIJA USNE ŠUPLJINE  
MULTIREZISTENTNIM GRAM-NEGATIVNIM  
BAKTERIJAMA KAO RIZIČNI ČIMBENIK ZA  
RAZVOJ VENTILATOROM PROUZROČENE  
UPALE PLUĆA**

DOKTORSKI RAD

Mentor(i): Prof.dr.sc. Željko Verzak

Prof.dr.sc. Slobodan Mihaljević

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Vesna Bratić

**COLONIZATION OF THE ORAL CAVITY  
WITH MULTI-RESISTANT GRAM-  
NEGATIVE BACTERIA  
AS A RISK FACTOR FOR THE  
DEVELOPMENT OF VENTILATED  
PULMONARY INFLAMMATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor(s): Prof.dr.sc. Željko Verzak

Prof.dr.sc. Slobodan Mihaljević

Zagreb, 2022.

Rad je ostvaren u: Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

**Lektor hrvatskog jezika:** Iva Udiković, prof.

**Lektor engleskog jezika:** Katarina Bijelić Beti, prof.

**Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:**

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_

**Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

(za svakog člana Povjerenstva naknadno se rukom na za to predviđeno mjesto upisuju ime i prezime, akademsko zvanje i ustanova)

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_

**Datum obrane rada:** \_\_\_\_\_ (upisuje se naknadno rukom)

Rad sadrži: 91 stranice

40 tablica

26 slika

CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je potpuno samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata upotrijebljenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu izvorni su doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za uporabu ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija, odnosno propusta u navođenju njihova podrijetla.

## **Zahvala**

Zahvaljujem mentorima prof.dr.sc. Željku Verzaku i prof.dr.sc. Slobodanu Mihaljeviću na nesebično podijeljenom znanju i iskustvu u stručnome i znanstvenom smislu te na kontinuiranoj potpori tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Branki Bedenić na dragocjenoj pomoći, strpljivosti i uloženom vremenu.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Slobodanu Mihaljeviću na poticaju za znanstvenom aktivnošću, na korisnim savjetima i na prijateljskom okružju koje podupire u našoj klinici. Jednako zahvaljujem svim svojim kolegama i kolegicama na potpori i praktičnoj pomoći tijekom prikupljanja podataka.

Posebna zahvala svim ispitanicima koji su sudjelovali u istraživanju.

Najveću zahvalnost za bezgraničnu potporu i razumijevanje upućujem cijeloj svojoj obitelji.

## Sažetak

### KOLONIZACIJA USNE ŠUPLJINE MULTIREZISTENTNIM GRAM-NEGATIVNIM BAKTERIJAMA KAO RIZIČNI ČIMBENIK ZA RAZVOJ VENTILATOROM PROUZROČENE UPALE PLUĆA

**Cilj:** Analizirati gram-negativne izolate dobivene iz usne šupljine nakon profilaktičke primjene antibiotika i njihove mehanizme rezistencije te ih usporediti s izolatima dobivenim iz aspirata traheje istih bolesnika.

**Materijali i metode:** Uzorci su prikupljeni u tri jedinice intenzivnog liječenja: kirurška, neurokirurška i kardiokirurška KBC-a Zagreb tijekom deset mjeseci. Bris usne šupljine uzet je prije profilaktičke primjene antibiotika i nakon pet dana kad je uzet aspirat traheje. Uzorak je podvrgnut bojenju prema Gramu i metilenskim modrilom te zasijan na krv i MacConkeyev agar za kvantitativnu analizu. Bakterije su identificirane konvencionalnim biokemijskim ispitivanjima i MALDI-TOFF. Dijagnoza upale pluća temeljila se na rendgenskom snimanju, CRP-ai polimorfonuklearnom broju. Izolati iz usne šupljine podvrgnuti su detaljnom testiranju antimikrobne osjetljivosti i analizi gena rezistencije te su uspoređeni s onima dobivenim iz aspirata traheje.

**Rezultati:** Utvrđena je izrazita raznolikost gram-negativnih bakterija i mehanizama rezistencije. Visoka stopa rezistencije i stečeni geni koji kodiraju ESBL i karbapenemazu pronađeni su među izolatima *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Glavni nalaz studije jest da je profilaktička primjena antibiotika u kirurškim jedinicama intenzivnog liječenja povezana s kolonizacijom usne šupljine i donjih dišnih putova gram-negativnim bakterijama, što dovodi do zaključka da bris usne šupljine kao neinvazivni uzorak može predvidjeti kolonizaciju donjih dišnih putova s rezistentnim gram-negativnim bakterijama i rizik od razvoja upale pluća.

**Zaključak:** Profilaktička primjena antibiotika širokog spektra u kirurgiji može promijeniti oralni mikrobiom i izazvati kolonizaciju usne šupljine gram-negativnim bakterijama, uključujući više lijekova ili patogene otporne na lijekove koji mogu dovesti do infekcija donjih dišnih putova u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji.

**Ključne riječi:** usna šupljina, ventilatorom prouzročena upala pluća, multirezistentne gram-negativne bakterije



## Summary

### COLONIZATION OF THE ORAL CAVITY WITH MULTI-RESISTANT GRAM - NEGATIVE BACTERIA AS A RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF VENTILATED PULMONARY INFLAMMATION

**Aim:** To analyze gram-negative isolates obtained from the oral cavity after prophylactic administration of antibiotics and their mechanisms of resistance and to compare them with isolates obtained from tracheal aspirates of the same patients.

**Materials and methods:** Samples were collected in three intensive care units: surgical, neurosurgical and cardiosurgical, KBC Zagreb for 10 months. A swab of the oral cavity was taken before the prophylactic administration of antibiotics and on the 5th day after it, when the tracheal aspirate was also taken. The sample was subjected to Gram and methylene blue staining and seeded on blood and MacConkey agar for quantitative analysis. Bacteria were identified by conventional biochemical tests and MALDI-TOFF. The diagnosis of pneumonia was based on X-ray, CRP, and polymorphonuclear count. Isolates from the oral cavity underwent detailed antimicrobial susceptibility testing and resistance gene analysis and were compared with those obtained from tracheal aspirates.

**Results:** A marked diversity of gram-negative bacteria and their mechanisms of resistance was found. High resistance rates and acquired genes encoding ESBL and carbapenemase were found among isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The main finding of the study is that the prophylactic use of antibiotics in surgical intensive care units is associated with colonization of the oral cavity and lower respiratory tract by gram-negative bacteria, leading to the conclusion that oral swab as a noninvasive sample may predict colonization of the lower respiratory tract with resistant gram-negative bacteria and the risk of developing pneumonia.

**Conclusion:** Prophylactic administration of broad-spectrum antibiotics in surgery can alter the oral microbiome and cause colonization of the oral cavity with gram-negative bacteria, including multiple drugs or drug-resistant pathogens that can lead to lower respiratory tract infections in patients on mechanical ventilation.

**Keywords:** oral cavity, ventilator-induced pneumonia, multidrug-resistant gram-negative bacteria

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Usna šupljina .....	2
1.1.1. Anatomija usne šupljine .....	2
1.2. Oralni mikrobiom .....	2
1.3. Povezanost oralnog mikrobioma i ventilatorom prouzročene upale pluća.....	6
1.4. Gram-negativne bakterije (GNB) .....	7
1.4.1. Bakterije rezistentne na više lijekova (MDR bakterije).....	7
1.4.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.4.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	16
1.4.1.3. Enterobakterije rezistentne na karbapenem .....	21
1.5. Ventilatorom prouzročena upala pluća (VAP) .....	30
1.6. Oralna higijena .....	40
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	41
2.1. Ciljevi .....	41
2.2. Hipoteze.....	41
<b>3. MATERIJALI I POSTUPCI/ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....	42
3.1. Protokol .....	42
3.2. Ispitanici .....	43
3.3. Laboratorijska karakterizacija izolata.....	44
3.3.1. Testiranje osjetljivosti na antibiotike .....	44
3.3.2. Fenotipska detekcija $\beta$ -laktamaza .....	45
3.3.2.1. Metoda dvostrukog diska .....	45
3.3.2.2. Metoda kombiniranih diskova .....	45
3.3.2.3. Detekcija AmpC $\beta$ -laktamaza .....	45
3.3.2.4. Detekcija karbapenemaza modificiranim Hodgeovim testom .....	46

3.3.2.5.	E test MBL za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza .....	46
3.3.2.6.	Metoda kombiniranih diskova za detekciju karbapenemaza .....	46
3.3.2.7.	Konjugacija .....	47
3.3.2.8.	Karakterizacija $\beta$ -laktamaza.....	47
3.3.3.	Analiza plazmida.....	48
3.4.	Obrada podataka .....	48
4.	<b>REZULTATI</b> .....	49
4.1.	Osnovni podatci o bolesnicima s VAP .....	49
4.2.	Broj sati ventilacije/broja dana liječenja u JIL-u/broj dana liječenja u bolnici bolesnika u kojih su izolirane gram-negativne bakterije.....	50
4.3.	Povezanost VAP s prisutnošću gram-negativnih bakterija u brisevima usne šupljine te aspiratu traheje .....	51
4.4.	Utjecaj antibiotika širokog spektra na selekcioniranje gram negativnih bakterija u usnoj šupljini .....	57
4.5.	Utjecaj fenotipa rezistencije na potrebu za promjenom antibiotika .....	57
4.6.	Molekularna detekcija gena.....	59
4.6.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	59
4.6.2.	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	61
4.6.3.	<i>Escherichia coli</i> .....	62
4.6.4.	<i>Proteus mirabilis</i> .....	62
4.6.5.	<i>Klebsiella aerogenes, Citrobacter freundii, Serratia marcescens</i> .....	62
4.6.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	62
4.6.7.	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	63
4.6.8.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	63
4.6.9.	<i>Burkholderia gladioli</i> .....	63
4.7.	Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s kroničnim bolestima.....	67
	( <i>Diabetes mellitus</i> , kronična bubrežna insuficijencija).....	67
4.7.1.	Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s <i>Diabetes mellitus</i> .....	67

4.7.2.	Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom.....	69
4.8.	Smrtnost u bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije .....	71
4.9.	Na različitim odjelima različito je zastupljena kolonizacija GNB .....	72
5.	<b>RASPRAVA</b> .....	75
6.	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	81
7.	<b>LITERATURA</b> .....	82
8.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	91

## Popis skraćenica

<b>AmpC</b>	ampicilinazetip C
<b>AMR</b>	antimikrobna rezistencija (eng. antimicrobial resistance)
<b>ARDS</b>	akutni respiratorni distres sindrom
<b>BLBLI</b>	inhibitori beta-laktama / beta-laktamaze (eng. $\beta$ -lactam / $\beta$ -lactamase inhibitors)
<b>CP</b>	proizvodi karbapenemazu (eng. produces carbapenemase)
<b>cpCRE</b>	karbapenem rezistentne enterobakterije koje proizvode karbapenemaze (eng. carbapenem-resistant enterobacteria that produce carbapenemases)
<b>CRAB</b>	karbapenem rezistentni <i>Acinetobacter Baumannii</i> (eng. Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter Baumannii</i> )
<b>CRE</b>	enterobakterije rezistentne na karbapenem (eng. Carbapenem-resistant enterobacteria)
<b>ESBL</b>	$\beta$ -laktamaze proširenog spektra (eng. extended-spectrum $\beta$ -lactamases)
<b>ESBLs</b>	$\beta$ -laktamaze proširenog spektra (eng.)
<b>ET</b>	endotrahealni tubus
<b>GES</b>	Guiana $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (eng. Guiana $\beta$ -extended spectrum lactamases)
<b>GIM</b>	German imipenemaza
<b>GNB</b>	gram-negativne bakterije
<b>HAP</b>	pneumonija stečena u bolnici (eng. Hospital-acquired pneumonia)
<b>IMI</b>	imipenem hidrolizirajuće $\beta$ -laktamaze
<b>IMP</b>	imipenemaza

<b>IMP</b>	imipenem rezistentna <i>Pseudomonas</i> karbapenemaza
<b>JIL</b>	jedinica intenzivnog liječenja
<b>KOPB</b>	kronične opstruktivne plućne bolesti
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemase
<b>LPS</b>	lipopolisaharid
<b>MALDI-TOF</b>	matrično potpomognuta laserska desorpcija (eng. matrix-assisted laser desorption)
<b>MBL</b>	metalo- $\beta$ -laktamaza
<b>MBLs</b>	metalo- $\beta$ -laktamaze
<b>MDR</b>	rezistencija na više lijekova (eng. multi drug resistance)
<b>MIC</b>	minimalna inhibitorna koncentracija (eng. minimal inhibitory concentration)
<b>MV</b>	mehanička ventilacija
<b>NDM</b>	New Delhi MBL
<b>NDM</b>	New Delhi metalo $\beta$ -laktamaze
<b>NGNB</b>	nefermentirane gram-negativne bakterije
<b>non-CP-CRE</b>	karbapenem rezistentne enterobakterije koje ne proizvode karbapenemaze (eng. carbapenem-resistant enterobacteria that do not produce carbapenemases)
<b>OmpA</b>	član proteina vanjske membrane
<b>OXA</b>	oksacilinaze
<b>OXA-48 / -181</b>	oksacilin-hidrolizirajuća karbapenemaza
<b>PDR</b>	rezistencija na lijekove (eng. pan drug resistance)

<b>RND</b>	ispusne pumpe s otporom – nodulacijskim dijeljenjem (eng. drain pumps with resistance-nodulation splitting)
<b>SIM</b>	Seoul imipenemza
<b>SMP</b>	Sao Paolo metalo $\beta$ -laktamaze
<b>sTREM-1</b>	topivi pokretački receptor eksprimiran na mijeloidnim stanicama (eng. soluble trigger receptor expressed on myeloid cells)
<b>TLR4</b>	Toll-like receptora 4
<b>VAP</b>	ventilatorom prouzročena upala pluća (eng. ventilator associated pneumonia)
<b>VIM</b>	Verona Integron-kodirani MBL
<b>XDR</b>	ekstenzivna rezistencija na lijekove (eng. extensive drug resistance)

## 1. UVOD

Mehanička ventilacija jest metoda liječenja vitalno ugroženih bolesnika u kojih je zbog bolesti ili ozljede respiratorna funkcija insuficijentna ili je potpuno prekinuta, a ubraja se u ključnu invazivnu terapiju u jedinicama intenzivnog liječenja (JIL) diljem svijeta. Bolesnici s umjetnim dišnim putom imaju visok rizik za razvoj infekcije dišnog puta osobito ventilacijom prouzročene upale pluća (VAP). VAP je druga po učestalosti infekcija u JIL, a na nju otpada oko 80% od svih infekcija povezanih s bolničkom skrbi. Odgovorna je za polovicu svih propisanih antibiotika u JIL. Incidencija se kreće u rasponu od 8 do 28% svih intubiranih bolesnika, a prema definiciji javlja se u bolesnika koji su dulje od 48 sati na mehaničkoj ventilaciji [1].

Uzročnici VAP najčešće su gram-negativne bakterije: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* i *Acinetobacter baumannii* [2].

Gram-negativne bakterije (GNB) razvile su najširi spektar rezistencije zbog višestrukih strukturnih prilagodbi i enzima koji razgrađuju antibiotike, uključujući  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL), AmpC cefalosporinaze i karbapenemaze [3].

VAP nastaje kao posljedica mikroaspiracije i translokacije patogenih mikroorganizama iz usne šupljine i ždrijela. Patogeni mikroorganizmi koloniziraju površinu endotrahealnog tubusa i stvaraju biofilm otporan na antimikrobne lijekove. VAP je povezan s produljenim trajanjem mehaničke ventilacije i duljinom boravka u JIL što ujedno znači i porast troškova liječenja kao i ekonomsko opterećenje zdravstvenog sustava. Unatoč napretku zdravstvene skrbi, antimikrobnoj terapiji, mehaničkoj ventilaciji i prevenciji VAP ipak ostaje jedan od vodećih uzroka bolničkog morbiditeta i mortaliteta. Smrtnost od VAP izrazito je visoka, a kreće se od 24 do 50%, a u starijih osoba i izrazito patogenih mikroorganizama doseže više od 60%. Danas postoje smjernice za prevenciju VAP među kojima se ističe higijena usne šupljine koja je često zanemarena unatoč brojnim dokazima da je ključna u prevenciji VAP [1].



## 1.1. Usna šupljina

Usna šupljina je šupljina u prednjem donjem dijelu glave koja s jezikom čini kompleksnu strukturu koja ima važnu ulogu u osiguravanju funkcije probavnoga i respiratornog sustava čovjeka [4].

### 1.1.1. Anatomija usne šupljine

Usna šupljina podijeljena je na dva dijela:

- Usno predvorje (*vestibulum oris*) – prostor omeđen usnama i obrazima s vanjske strane, a alveolarnim nastavcima i zubima s unutarnje strane kojima je ujedno odvojena od prostora prave usne šupljine.
- Prava usna šupljina (*cavum oris*) – prostor omeđen tvrdim nepcem i dijelom mekog nepca s gornje strane, jezikom i dnom usne šupljine s donje strane i dijelom mekog nepca sa stražnje strane gdje ujedno i usna šupljina prelazi u ždrijelo [4].

## 1.2. Oralni mikrobiom

Pojam mikrobiom prvi je put uveo Joshua Lederberg, američki molekularni biolog, a označava simbiotske ekološke zajednice i sve patogene mikroorganizme koji žive u ljudskom tijelu. Mikroorganizmi koji se nalaze u usnoj šupljini imaju naziv oralna mikroflora, oralna mikrobiota ili oralni mikrobiom [5][6].

U usnoj šupljini mikroorganizmi se mogu skupljati na zubima, gingivi, jeziku, unutrašnjoj strani obraza, usnama te na tvrdom i mekom nepcu. Različite površine privlače različite mikrobne zajednice jer svaka površina pruža jedinstven ekosustav s optimalnim uvjetima i hranjivim sastojcima za svoje mikrobe. Oralni mikrobiom važan je dio ljudskog mikrobioma jer je s obzirom na funkciju usne šupljine velika vjerojatnost širenja mikroorganizama iz područja usta u ostale dijelove tijela (primarno probavni trakt i pluća) i tako posljedično uzrokovati kardiovaskularne bolesti, srčani udar, prijevremeni porod, diabetes mellitus ili upalu pluća. Oralni mikrobiom može uzrokovati niz oralnih infekcija kao što su karijes, paradontoza, infekcije endodontskog prostora, alveolarni osteitis i tonzilitis [5].



Slika 1. Gram-pozitivna flora usne šupljine [6]



Slika 2. Gram-negativna flora usne šupljine [6]

Oralni mikrobní ekosustav ima ključnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja. Širok raspon mikroorganizama nastanjuje usnu šupljinu uključujući bakterije, gljivice, prione, protozoe i povremeno viruse. Ti mikroorganizmi tvore složen ekosustav usne šupljine koji utječe na oralno i sistemsko zdravlje. Oralna flora kritično bolesnih razlikuje se od oralne flore zdrave osobe. Izmijenjena oralna mikrobiota može biti usko povezana s oralnim i sustavnim bolestima. Buduća istraživanja koja će precizno identificirati ključnu oralnu mikrobiotu u zdravlju i bolestima pridonijet će boljem razvoju učinkovitih alata za modulaciju oralne mikrobiote. S obzirom na ulogu oralnih mikroorganizama u uzrokovanju i patogenezi oralnih i sustavnih bolesti, važno je poboljšati oralnu zaštitu od patogena i održati dinamičku ravnotežu oralne mikroekologije [5].

## ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA ORALNI MIKROBIOM

Na oralni mikrobiom utječe velik broj čimbenika koji se mogu podijeliti u sljedećih nekoliko skupina [7]:

- anatomske čimbenici – oblik i položaj zubi, loša kvaliteta zubnih popravaka,
- slina – djeluje na održavanje oralnog zdravlja svojim podmazujućim, antibakterijskim i puferskim svojstvima,
- sulkusna tekućina,
- mikrobiološki čimbenici – mikroorganizmi u usnoj šupljini u međusobnoj su interakciji te tako mogu poticati ili suprimirati rast bakterija,
- ostali čimbenici – pH vrijednost, oksidacijsko-redukcijski potencijal, antibiotska terapija, prehrana i jatrogeni čimbenici.

## BIOFILM PLAKA

Biofilm plaka je trajni spremnik mikroorganizama koji može biti vezan za meka ili tvrda tkiva usne šupljine, a sadržava žive i mrtve bakterije i njihove izvanstanične produkte, kao i produkte domaćina (uglavnom iz sline). Što je veća razina oralnih bakterija, to je veća količina biofilma plaka u usnoj šupljini. Čak 65% infekcija u ljudskom tijelu uzrokovano je mikroorganizmima iz biofilma plaka, koji su dokazano otporniji na antimikrobna sredstva od drugih mikroorganizama što otežava liječenje infekcija [7].

### **1.3. Povezanost oralnog mikrobioma i ventilatorom prouzročene upale pluća**

U bolesnika koji su na mehaničkoj ventilaciji, odnosno u kojih je postavljen endotrahealni tubus (ET), onemogućena je normalna funkcija filtriranja, zagrijavanja i vlaženja zraka koji inače ulazi kroz nos te je time ugrožen integritet pluća, odnosno pluća su izložena infekciji. Mukocilijarni obrambeni mehanizmi također su ugroženi od ET. Oralna flora kritično bolesnih razlikuje se od flore normalne zdrave odrasle osobe. Unutar 48 sati od endotrahealne intubacije dolazi do iscrpljenja fibronektina koji je odgovoran za prevladavanje gram-negativnih mikroorganizama zamjenjujući normalno prisutne gram-pozitivne mikroorganizme. U nedostatku učinkovite oralne higijene razvijaju se na zubima naslage u roku od 72 sata koje mogu biti spremnici potencijalno respiratornih patogena [8].

Uz žvakanje i gutanje slina igra važnu ulogu u održavanju normalne oralne flore. Sadrži važan enzim, lizozim, koji inhibira rast bakterija. U bolesnika na mehaničkoj ventilaciji ET i otvorena usta dovode do isušivanja sluznice, čime se povećava rizik od karijesa, parodontalne bolesti itd. Što je veća razina oralnih bakterija, to je veća količina biofilma pričvršćena na bolesnikovim zubima [8].

Četiri su načina kako bakterije dođu do pluća u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji:

1. nakupljanjem sekreta oko balončića ET,
2. mikro aspiracije pri postavljanju ET i manipulaciji ET,
3. stvaranjem biofilma unutar ET koji proizvode gram-negativne bakterije,
4. oštećenjem mukocilijarnog klirensa za lučenje sluzi.

U bolesnika na mehaničkoj ventilaciji normalna mikrobna flora domaćina mijenja se zbog same bolesti, primjene antibiotske terapije, uz nedostatak mehanizama zaštite i čišćenja dišnih putova [9].

## 1.4. Gram-negativne bakterije (GNB)

Gram-negativne bakterije (GNB) među najvažnijim su svjetskim javnozdravstvenim problemima zbog visoke rezistencije na antibiotike. Neki od mehanizama rezistencije uključuju efluks pumpe, promjenu mjesta vezanja lijeka i propusnosti membrane zbog promjena na porinima, enzima razgradnje, i konformacijsku promjenu lijeka koja kulminira njegovom inaktivacijom [10].

GNB ima dvije membrane, vanjsku i unutarnju. Vanjska membrana izražava snažni induktor imunskog odgovora, lipopolisaharid (LPS), koji se sastoji od triju jedinica: hidrofilnog polisaharida, O-antigena i hidrofobne domene poznate kao lipid A. Lipid A odgovoran je za veću endotoksičnu aktivnost ovih bakterija. LPS je heterogen u različitim bakterijskim skupinama, a neke bakterije taj antigen slabo manifestiraju zbog genetskih promjena i ne prepoznaje ih Toll-like receptor. Suprotno tomu, postoje skupine GNB koje mogu pokrenuti takav odgovor u velikim omjerima. Dakle, LPS može pokrenuti urođeni imunski odgovor preko Toll-like receptora 4 (TLR4), koji se javlja u mnogim imunskim stanicama, kao što su monociti, makrofagi, dendritične stanice i neutrofilni. Rezultirajuća aktivacija urođenog imunskog odgovora posredovanog LPS s TLR4 receptorima kulminira pogoršanim odgovorom u proizvodnji citokina, kemokina i interferona i njihovom supresijom [10].

Nefermentirane gram-negativne bakterije (NGNB) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes spp*, *Moraxella spp*.) uzrokuju ozbiljne, smrtonosne infekcije u bolničkom okruženju, a posebno u JIL [10].

### 1.4.1. Bakterije rezistentne na više lijekova (MDR bakterije)

Procjena je da se godišnje u svijetu proizvede otprilike 100.000 tona antibiotika, a njihova je upotreba ostavila velik utjecaj na život bakterija na zemlji. Sve više sojeva bakterija postaje otporno na djelovanje antibiotika, dok su neki otporni na više vrsta antibiotika, ali i na kemoterapeutike. Ova je pojava poznata pod nazivom višestruka rezistencija na lijekove (MDR) i jedan je od glavnih zdravstvenih problema današnjice [11].

MDR uzrokuju više od 670.000 infekcija i 33.000 smrtnih slučajeva na godinu samo u Europskoj uniji. Od njih veliku većinu infekcija i smrtnih slučajeva uzrokuje samo nekolicina vrsta–MDR-ova: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*. Ti patogeni posjeduju mnoštvo mehanizama rezistencije na antibiotike, poput proizvodnje enzima koji deaktiviraju antibiotike, promjena u ciljnim molekulama antibiotika ili smanjenja unutar stanične koncentracije antibiotika, što ih čini neosjetljivima na više antibiotika [12].

Rezistencija na više lijekova u bakterijama može nastati jednim od dva mehanizma. Prvo, ove bakterije mogu akumulirati više gena, od kojih svaki kodira rezistenciju na jedan lijek ili skupinu lijekova. Ova se akumulacija događa tipično na rezistentnim (R) plazmidima.

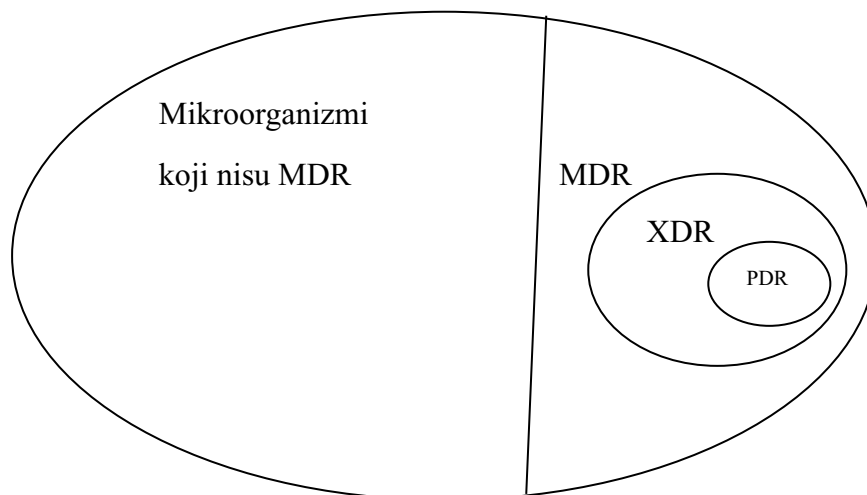
Drugo, do rezistencije na više lijekova može doći i pojačanom ekspresijom gena koji kodiraju efluks pumpe za istjecanje lijekova istiskujući širok spektar antibiotika [13].

Antimikrobna rezistencija (AMR) definira se kao neosjetljivost mikroorganizama na antimikrobno sredstvo na koje su prije bili osjetljivi [11].

Rezistencija na više lijekova (MDR) definirana je kao stečena neosjetljivost na najmanje jedan antibiotik u tri ili više antimikrobnih kategorija [14].

Ekstenzivna rezistencija na lijekove (XDR) definirana je kao neosjetljivost na najmanje jedan antibiotik u svim kategorijama osim dvije ili manje skupine antimikrobnih lijekova [14].

Rezistencija na sve antibiotike (PDR) definirana je kao neosjetljivost na sve antibiotike u svim antimikrobnim kategorijama [14].



Slika 3. Dijagram koji prikazuje međusobni odnos MDR, XDR i PDR [15]

Rezistencija na antibiotike eksponencijalno je porasla tijekom posljednjeg desetljeća, a izolacija MDR patogena identificirana je kao neovisni prediktor početne neodgovarajuće antibiotske terapije. Rizik od nastanka MDR temelji se na kolonizaciji i prethodnoj antibiotskoj terapiji. Primjenom nadzora nad antibioticima u bolnicama moglo bi se spriječiti širenje MDR bakterija [14].

Najčešći i najozbiljniji MDR patogeni obuhvaćeni su kraticom ESKAPE, koji uključuju: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* i *Enterobacter spp.* [16].

Tablica 1. Definicije za MDR, XDR i PDR bakterije [15]

<b>BAKTERIJE</b>	<b>MDR</b>	<b>XDR</b>	<b>PDR</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u 3 antimikrobne kategorije u Tablici 4	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u svim antimikrobnim kategorijama, osim u 2 ili manje u Tablici 4	Neosjetljivost na sve antibiotike u svim antimikrobnim kategorijama za svaku bakteriju
<i>Acinetobacter spp</i>	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u 3 antimikrobne kategorije navedene u Tablici 5	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u svim antimikrobnim kategorijama, osim u 2 ili manje u Tablici 5	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u 3 antimikrobne kategorije navedene u Tablici 6	Izolat nije osjetljiv na najmanje 1 antibiotik u svim antimikrobnim kategorijama, osim u 2 ili manje u Tablici 6	



## ČIMBENICI RIZIKA

Tablica 2. Čimbenici rizika za infekcije povezane sa zdravstvenom zaštitom i infekcije bakterijama otpornim na lijekove [17]

<b>ČIMBENICI RIZIKA ZA INFEKCIJE POVEZANE SA ZDRAVSTVENOM ZAŠTITOM</b>	Hospitalizacija $\geq 2$ dana u prethodnih 90 dana
	Boravak u domu umirovljenika ili ustanovi za dugotrajnu njegu
	Kućna infuzijska terapija uključujući primjenu antimikrobnih sredstava
	Dugotrajna dijaliza
	Kućna njega
<b>ČIMBENICI RIZIKA ZA INFEKCIJU BAKTERIJAMA REZISTENTNIM NA LIJEKOVE</b>	Član obitelji s patogenom otpornim na više lijekova
	Antimikrobna terapija u prethodnih 90 dana
	Trenutačna hospitalizacija $\geq 5$ dana
	Velika učestalost rezistencije na antibiotike u zajednici ili u određenoj bolničkoj jedinici
	Imunosupresija

### MEHANIZMI REZISTENCIJE:

1. gubitak porina, što smanjuje kretanje lijeka kroz staničnu membranu,
2. prisutnost  $\beta$ -laktamaza u periplazmatskom prostoru, što razgrađuje  $\beta$ -laktamski antibiotik,
3. povećana ekspresija efluks transmembranske pumpe, koja izbacuje lijek iz bakterije,
4. prisutnost enzima koji modificiraju antibiotike, a produkt enzimske modifikacije nema antimikrobno djelovanje,
5. mutacije ciljnog mjesta koje sprečavaju vezanje antibiotika za njegovo mjesto djelovanja,
6. ribosomske mutacije ili modifikacije koje sprečavaju vezivanje i inhibiranje sinteze proteina,
7. metabolički obilazni mehanizmi koji se koriste alternativnim metaboličkim putovima za obilaženje inhibicijskog učinka antibiotika,
8. mutacija u negativno nabijenom lipopolisaharidu vanjske membrane, zbog čega se pozitivno nabijeni polimiksin antibiotika ne može vezati na ciljnu molekulu [17].

## LIJEČENJE

Tablica 3. Preporučena terapija za infekcije uzrokovane rezistentnim GNB [17]

<b>UZROČNICI REZISTENTNI NA LIJEKOVE</b>	<b>PREPORUČENA TERAPIJA</b>
<i>Enterobacteriaceae</i> koje proizvode $\beta$ -laktamazu proširenog spektra (ESBL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- meropenem 1 – 2 g intravenski svakih 8 sati; ili</li> <li>- imipenem 500 mg intravenski svakih 6 sati;</li> <li>- doripenem 500 mg intravenski svakih 8 sati ili u obliku infuzije od 1 sata ili 4 sata</li> </ul>
<i>Enterobacteriaceae</i> koje proizvode karbapenemazu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kolistin 2,5–5,0 mg baze kolistina / kg tjelesne težine / dan u 2 do 4 podijeljene doze ili</li> <li>- tigeciklin 100 mg intravenski kao puna doza, zatim 50 mg intravenski svakih 12 sati</li> </ul>
<i>P. aeruginosa</i> i <i>A. baumannii</i> otporni na karbapeneme	<p>Za <i>P. aeruginosa</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kolistin kao za <i>Enterobacteriaceae</i> koji proizvode karbapenemazu</li> </ul> <p>Za <i>A. baumannii</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- kolistin kao za <i>Enterobacteriaceae</i> koji proizvode karbapenemazu; ili</li> <li>- ampicilin-sulbaktam, do 6 g sulbaktama intravenskina dan; ili</li> <li>- tigeciklin 100 mg intravenska početna doza, zatim 50 mg intravenski svakih 12 sati</li> </ul> <p>Moguće alternative:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- produljena infuzija meropenema 1 – 2 g u intravenskoj infuziji tijekom 3 sata svakih 8 sati;</li> <li>- doripenem 500 mg – 1 g u intravenskoj infuziji tijekom razdoblja od 4 sata svakih 8 sati; ili</li> <li>- imipenema 1 g u intravenskoj infuziji tijekom 3 sata svakih 8 sati;</li> <li>- kombinirana terapija s rifampinom, minociklinom ili doksiciklinom ili azitromicinom</li> </ul> <p>Za upalu pluća:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nebulizirani kolistimetat natrij 1 do 3 milijuna IU / dan u podijeljenim dozama (razrijeđen u sterilnoj fiziološkoj otopini), primijenjen uobičajenim raspršivačem ili nebulizirani aminoglikozidi.</li> </ul>

Liječenje infekcije uzrokovane rezistentnim GNB uključuju produljenu infuziju (3 do 4 sata) ili kontinuiranu infuziju  $\beta$ -laktama i aerosolizirane antibiotike za liječenje VAP. Nebulizirani antibiotici poput tobramicina, amikacina i kolistina pokušavaju smanjiti sustavnu toksičnost i poboljšati dotok lijeka na mjestu infekcije ili se daju kao dodatak sustavno primijenjenom lijeku [17].

#### 1.4.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

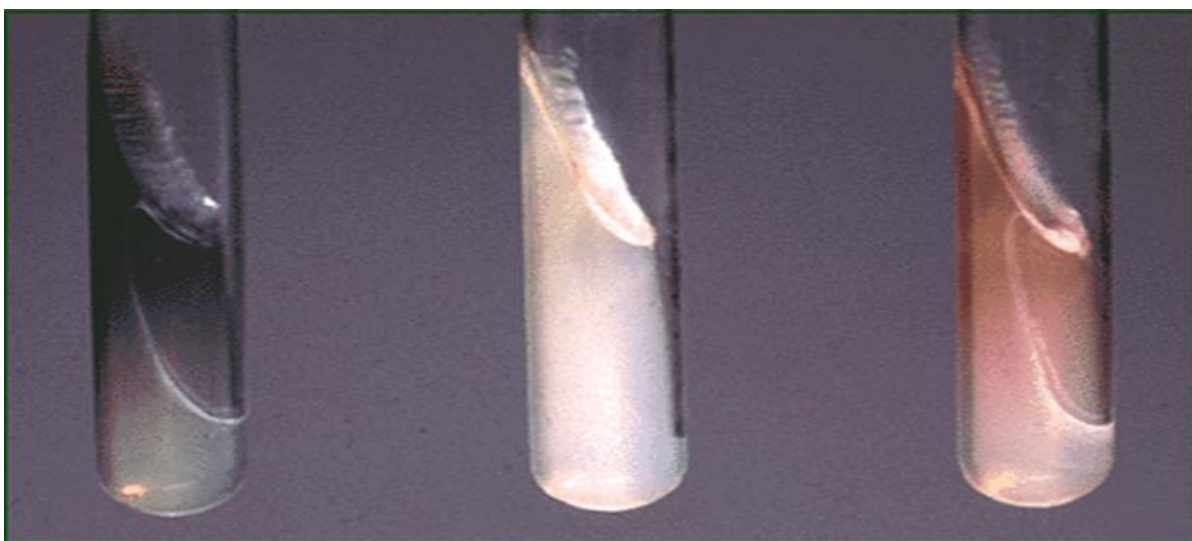
*P. aeruginosa* je gram-negativna bakterija koji ima sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima okoliša, a jedan je od vodećih nosokomijalnih patogena u svijetu. Najčešći je uzročnik VAP, a rezistentna je na većinu antimikrobnih lijekova koji su trenutačno u upotrebi. *P. aeruginosa* iskazuje urođenu otpornost na prirodne i semisintetske peniciline u kombinaciji s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza, 1. i 2. generaciju cefalosporina, cefotaksim, cefotriakson, kloramfenikol, makrolide i trimetropin [18].



Slika 4. *Pseudomonas aeruginosa*. Izvor: KBC Zagreb



Slika 5. Antibiogram izolata *P. aeruginosa*. Vidljiva je multipla rezistencija na antibiotike iz različitih klasa. Izvor: KBC Zagreb



Slika 6. Pigmenti koje stvara *P. aeruginosa* – fluorosein, piorubin i piocianin koji su važni čimbenici virulencije. Izvor: KBC Zagreb

#### ČIMBENICI RIZIKA ZA AKVIZICIJU MULTIREZISTENTNOG SOJA:

- bolničko liječenje,
- mehanička ventilacija,
- operacijski zahvati,
- opekline,
- neutropenija [19].

## MEHANIZMI REZISTENCIJE:

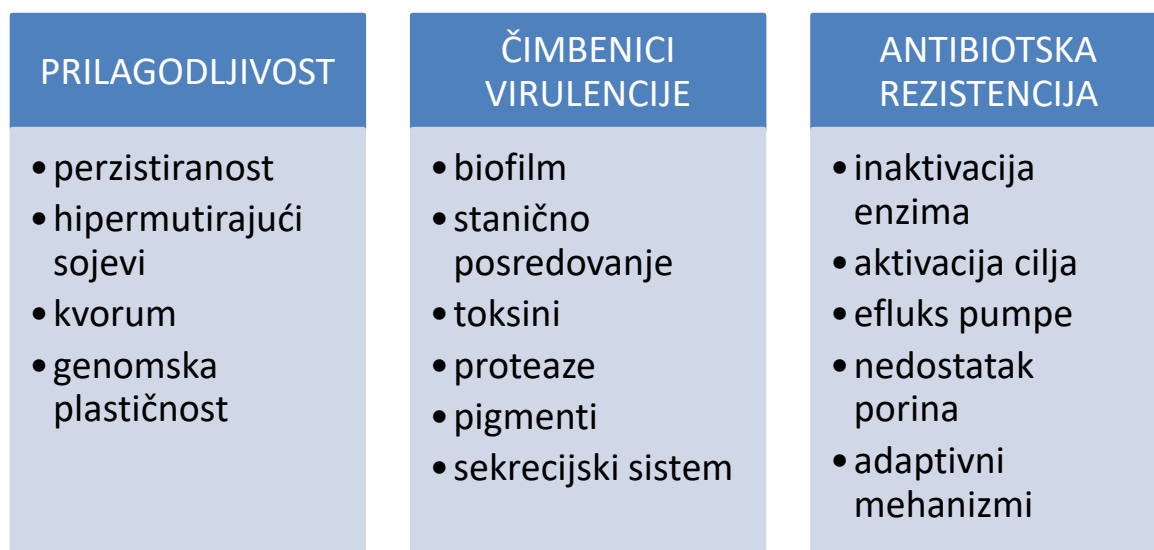
*P. aeruginosa* pokazuje rezistenciju na različite antibiotike, uključujući aminoglikozide, fluorokinolone i  $\beta$ -laktame [20].

Glavni mehanizmi rezistencije na antibiotike u *P. aeruginosa* mogu se klasificirati na unutarnju, stečenu i adaptivnu rezistenciju. Unutarnja rezistencija *P. aeruginosa* uključuje nisku propusnost vanjske membrane, ekspresiju pumpi za protok energije koje izbacuju antibiotike iz stanice i proizvodnju enzima za aktiviranje antibiotika. Stečena rezistencija *P. aeruginosa* može se postići horizontalnim prijenosom gena rezistencije ili mutacijskim promjenama. Prilagodljiva rezistencija *P. aeruginosa* uključuje stvaranje biofilma u plućima zaraženih bolesnika, pri čemu biofilm služi kao difuzijska barijera za ograničavanje pristupa antibiotika bakterijskim stanicama. U biofilmu se mogu stvoriti stanice koje su otporne na više lijekova, kao i na antibiotike; ove su stanice odgovorne za produljene i ponavljajuće infekcije u bolesnika. Razvoj novih antibiotika ili alternativnih terapijskih strategija za liječenje infekcije uzrokovane bakterijom *P. aeruginosa* hitno je potreban za bolesnike čije su infekcije otporne na konvencionalne antibiotike. Posljednjih su godina istraženi novi antibiotici s novim načinima djelovanja, kao i novi načini primjene i rezistencija na modifikaciju bakterijskih enzima. Neki od ovih novijih antibiotika pokazuju izvrsno *in vitro* antibakterijsko djelovanje na bakteriju *P. aeruginosa* [20].

Urođena rezistencija bakterija na antibiotike odnosi se na njezinu urođenu sposobnost da umanjuje učinkovitost određenog antibiotika kroz svojstvene strukturne ili funkcionalne značajke. Pokazalo se da *P. aeruginosa* posjeduje visoku razinu intrinzične rezistencije na većinu antibiotika kroz ograničenu propusnost vanjske membrane, protočne sustave koji pumpaju antibiotike iz stanice i proizvodnju enzima koji inaktiviraju antibiotike poput  $\beta$ -laktamaza [20]. Bakterija *P. aeruginosa* urođeno je otporna na prirodne i semisintetske peniciline te njihove kombinacije s inhibitorima, prvu i drugu generaciju cefalosporina, cefotaksim, ceftriakson, makrolide, tetracikline, sulfonamide i trimetoprim. Stečena rezistencija nastaje zbog akvizicije  $\beta$ -laktamaza širokoga i proširenog spektra i karbapenemaze.

U *P. aeruginosa* najčešći mehanizam rezistencije na karbapeneme su metalo- $\beta$ -laktamaze koje spadaju u klasu B (IMP, VIM, NDM, DIM, AIM), a rjeđe klasu A (KPC, GES) ili D (OXA-181). Rezistencija na imipenem može nastati zbog gubitka OprD porina vanjske membrane koji služi za influks karbapenema, a na meropenem zbog hiperekspresije efluks sustava (MexAB,

MexCD, MexEF). Imipenem je velika molekula i teže prolazi kroz promijenjene porine, a meropenem je bolji supstrat za efluks pumpe [20][21].



Slika 7. Glavne komponente patogenosti *P. aeruginosa* [20][21]

Tablica 4. *P.aeruginosa*; antimikrobne kategorije i agensi koji se koriste za definiranje MDR, XDR i PDR [15]

ANTIMIKROBNA KATEGORIJA	ANTIMIKROBNO SREDSTVO
Aminoglikozidi	gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin
Karbapenemi	Imipenem, meropenem, doripenem
Cefalosporini	ceftazidime, cefepime
Fuorokuinoloni	ciprofloksacin, levofloxacin
Penicilini + inhibitori β-laktamaze	ticarcillin-klavulanska kiselina piperacillin-tazobactam
Monobaktami	aztreonam
Fosfomicin	fosfomicin
Polimksini	Kolistin, polymyxin B
<b>Kriteriji za definiranje MDR, XDR i PDR kod <i>P. aeruginosa</i></b> <b>MDR: neosjetljiv na jedno sredstvo u tri antimikrobne kategorije.</b> <b>XDR: nije osjetljiv na jedno sredstvo u svim kategorijama osim u dvije.</b> <b>PDR: nije osjetljiv na sva navedena antimikrobna sredstva.</b>	

## LIJEČENJE

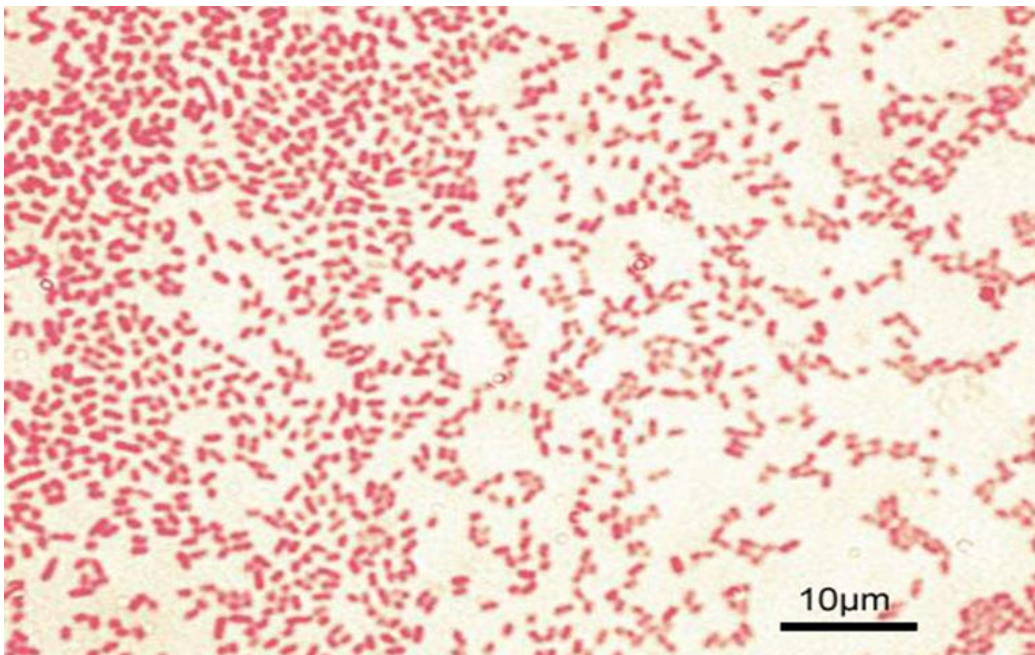
Beta-laktamski ( $\beta$ -laktamski) antibiotici među najvažnijim su lijekovima u terapiji infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa*, s posebnim naglaskom na karbapeneme [21]. Trenutačne terapijske mogućnosti liječenja infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa* uporaba su različitih kombinacija antibiotika i razvoj novih antibiotika. Pokazalo se da su novi antibiotici učinkovitiji u liječenju infekcija uzrokovanih s *P. aeruginosa* i imaju nižu učestalost razvoja rezistencije u usporedbi s postojećim antibioticima zbog njihovih novih načina djelovanja, djelotvornog davanja lijekova (npr. inhalacijski antibiotici) i rezistencije na modifikaciju bakterijskim enzimima [20].

### 1.4.1.2. *Acinetobacter baumannii*

*A. baumannii* je aerobna nefermentirajuća gram-negativna bakterija koja opstaje podjednako u suhom i vlažnom okruženju. Otporna je na dezinfekcijska sredstva, formira biofilm te brzo stječe različite mehanizme rezistencije na antibiotike. Smatra se da su ta svojstva dovela do brzog endemskog širenja *A. baumannii* u bolničkom okruženju. Osobe oslabljena imuniteta podložne su infekcijama, osobito one koje su bile više od 90 dana na bolničkom liječenju. Veća smrtnost i veći troškovi zdravstvene zaštite povezani su s kasnim prepoznavanjem i liječenjem VAP koji uzrokuje multirezistentni *A. baumannii*. Znanje o čimbenicima rizika i povezanosti smrtnosti s različitim stupnjevima antimikrobne rezistencije relevantno je kako bi se brže mogla uspostaviti dijagnoza i samim time povećati šanse za pozitivan ishod liječenja bolesnika [16].



Slika 8. *Acinetobacter baumannii*. Izvor: KBC Zagreb



Slika 9. Mikroskopski preparat, vide se sitni gram-negativni kokobacili. Izvor: KBC Zagreb





Slika 10. E test za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza. Vidljivo je smanjenje MIK imipenema u prisustvu EDTA kao metalnog kelatora što upućuje na produkcija metalo- $\beta$ -laktamaze. Izvor: KBC Zagreb

*A.baumannii* pokazuje urođenu otpornost na prirodne i semisintetske peniciline, inhibitore  $\beta$ -laktama osim sulbaktama, 1. i 2. generaciju cefalosporina, cefotaksim, cefotriakson, fosfomicin i makrolide [22].

## ČIMBENICI RIZIKA

Unatoč opsežnom istraživanju potencijala virulencije ovog patogena i dalje se malo zna o njegovu pravom patogenom potencijalu. Iako se vjeruje da nekoliko čimbenika može pridonijeti virulencijskom potencijalu *A. baumannii*, određen je jedan čimbenik, OmpA, član proteina vanjske membrane (OMP), koji znatno pridonosi potencijalu patogena koji uzrokuje bolest [16]. OmpA se veže za epitel i mitohondrije domaćina, jednom vezan za mitohondrije OmpA izaziva mitohondrijsku disfunkciju i uzrokuje bubrenje mitohondrija. Nakon toga slijedi oslobađanje citokroma C, hem proteina, što dovodi do stvaranja apoptosoma. Sve ove reakcije pridonose apoptozi stanice. OmpA, kao najrasprostranjeniji površinski protein na patogenu, uključen je u rezistenciju i stvaranje biofilma – dvije ključne strategije preživljavanja i važni čimbenici povezani s virulencijom koji pomažu u preživljavanju bakterija unutar i izvan

domaćina. Sposobnost bakterije *A. baumannii* da stvara biofilme omogućuje joj ustrajan rast u nepovoljnim uvjetima i okolišu. Okupljanje i proizvodnja proteina povezanih s biofilmom pridonose pokretanju proizvodnje i sazrijevanju biofilma nakon što se *A. baumannii* pričvrsti na određene površine. Ostali ključni proteini za koje je dokazano da pridonose virulenciji *A. baumannii* uključuju fosfolipazu D i C. Dok je fosfolipaza D važna za rezistenciju na humani serum i patogenezu, fosfolipaza C povećava toksičnost za epitelne stanice [16].

## MEHANIZMI REZISTENCIJE

Mehanizmi rezistencije *A. baumannii* na antibiotike mogu se svrstati u tri skupine. Prvo se rezistencija može postići smanjenjem propusnosti vanjske membrane i tako spriječiti pristup cilju. Drugo, bakterije mogu zaštititi ciljno mjesto antibiotika genetskom mutacijom ili posttranslacijskom modifikacijom, i treće, antibiotici se mogu izravno inaktivirati hidrolizom ili modifikacijom. Uz to *A. baumannii* može stvarati biofilme i tako produljiti svoje preživljavanje na medicinskim uređajima, poput ventilatora u JIL [22].

Antimikrobna rezistencija kod Carbapenem rezistentnog *A. Baumannii* (CRAB) rezultat je složene interakcije između višestrukih mehanizama rezistencije uključujući proizvodnju enzima koji modificira antimikrobno sredstvo, hiperekspresiju efluks pumpi, promjene porina i mutacije ciljnih molekula. Često je teško utvrditi doprinos pojedinačnih mehanizama rezistencije njegovu ukupnom fenotipu. Međutim, fenotip CRAB nastaje najčešće zbog produkcije karbapenemaza koje spadaju u klasu A, B ili D (karbapenem – hidrolizirajuće oksacilinaze– CHDL). Danas dominira OXA-23 koja je kodirana plazmidno i širi se diljem svijeta te istiskuje ostale tipove. Osim nje opisane su i OXA-24/40-like i OXA-58-like. CHDL nisu učinkoviti enzimi, slabo hidroliziraju karbapeneme tako da klinički znatna rezistencija nastaje u kombinaciji s drugim mehanizmima kao što je efluks i promjene na porinima vanjske membrane. Također su objavljena izvješća, doduše rijetka, CRAB izolata koji proizvode metalo- $\beta$ -laktamaze (tj. VIM, IMP, NDM) [23].

Smanjena osjetljivost na karbapeneme može nastati i zbog povećane produkcije intrinzične OXA-51 oksacilinaze zbog insercijske sekvencije ISAba1 ispred *bla*<sub>OXA-51</sub> gena. Postoji više od 300 varijanti OXA-51 enzima. Povišena ekspresija *bla*<sub>OXA-51</sub> gena dovodi do povišenja MIK karbapenema do 32 mg. Hiperekspresija efluks pumpi i promjene u ekspresiji porina također pridonose CRAB fenotipu. Identificirano je nekoliko pumpnih sustava, a neki utječu na više klasa antibiotika. Najbolje je opisana pumpa AdeABC, koja uzrokuje smanjenu osjetljivost na

karbapeneme, cefalosporine, aminoglikozide i tetracikline, uključujući eravaciklin. Mutacije u AdeABC uobičajene su i često posredovane mutacijama u proteinu regulatora AdeS44. Porin s najvažnijim učinkom na antimikrobnu osjetljivost na karbapeneme u *A. baumannii* je CarO, iako se čini da ovo ima veći učinak na osjetljivost na imipenem u usporedbi s meropenemom. Mutacije PBP3 na ciljanom mjestu također mogu dovesti do rezistencije na meropenem i sulbaktam u *A. baumannii*. Visoka rezistencija na meropenem primijećena je kad su se te mutacije kombinirale s promjenama u AdeB-u (AdeABC sustav) [23].

Tablica 5. *A. baumannii*; antimikrobne kategorije i agensi koji se koriste za definiranje MDR, XDR i PDR[15]

ANTIMIKROBNA KATEGORIJA	ANTIMIKROBNO SREDSTVO
Aminoglikozidi	gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin
Antipseudomonasni karbapenemi	imipenem, meropenem, doripenem
Cefalosporini proširenog spektra	ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefepime
Antipseudomonasni Fluorokuinoloni	ciprofloksacin, levofloksacin
Antipseudomonasni penicilini + inhibitori $\beta$ -laktamaze	tikercillin-klavulanska kiselina, piperacillin-tazobactam
Inhibitori folne kiseline	trimetoprim-sulfametoksazol
Penicilini + inhibitori $\beta$ -laktamaze	ampicilin-sulbaktam
Polimiksini	kolistin, polymyxin b
Tetraciklini	tetraciklin, doksciklin, minocycline
<b>Kriteriji za definiranje MDR, XDR i PDR u <i>A. baumannii</i>:</b> <b>MDR: neosjetljiv na jedno sredstvo u tri antimikrobne kategorije.</b> <b>XDR: nije osjetljiv na jedno sredstvo u svim kategorijama osim u dvije.</b> <b>PDR: nije osjetljiv na sva navedena antimikrobna sredstva.</b>	

## LIJEČENJE

Trenutačno najčešće korišteni antibiotici za infekcije koje uzrokuje *A. baumannii* uključuju kombinacije inhibitora  $\beta$ -laktamaze (cefoperazon/sulbaktam, ampicilin/sulbaktam), karbapeneme (meropenem, imipenem), tetracikline (minociklin), aminoglikozide (etimicin, amikacin) kinolone, kao i cefalosporin treće i četvrte generacije koji imaju antibakterijsko djelovanje usmjereno na *A. baumannii*. Kombinirani režimi dva ili čak tri lijeka često se rabe u liječenju infekcija CRAB sojevima. Najčešći režim kombiniranja zasnovan je na kombinacijama karbapenema s kolistinom ili vankomicinom. Tigeciklin se može rabiti za infekcije mekih tkiva, pneumoniju i intraabdominalne infekcije [24].

### 1.4.1.3. Enterobakterije rezistentne na karbapenem

Enterobakterije rezistentne na karbapenem (CRE) bakterije su iz porodice *Enterobacteriaceae* koje imaju sposobnost preživljavanja i rasta u prisutnosti klinički znatnih koncentracija karbapenema.



Slika 11. *E. coli*. Izvor: KBC Zagreb



Slika 12. *Klebsiella pneumoniae*. Izvor: KBC Zagreb



Slika 13. Mikroskopska slika Enterobakterija. Vidi se gram-negativni štapići. Izvor: KBC Zagreb

Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) definira CRE kao enterobakterije sa smanjenom osjetljivošću na najmanje jedan karbapenem ili su producenti karbapenemaza [27]. Karbapenemaze koje se najčešće susreću u enterobakterija spadaju u klasu A (SME, IMI, NMC, GES, KPC), B (VIM, IMP, NDM) i klasu D (OXA-48, OXA-181) [25].

## ČIMBENICI RIZIKA

Čimbenici rizika za nastanak infekcije CRE uključuju putovanje u endemsko područje, imunokompromitiranost, mehaničku ventilaciju i poodmaklu dob. Svi ovi čimbenici čine CRE povezanim sa zdravstvenom skrbi najvažnijim čimbenikom širenja rezistencije na karbapenem. Ključni pokazatelj CRE infekcija može biti pogoršanje stanja unatoč empirijskoj antibiotskoj terapiji. Terapijski neuspjeh empirijske terapije može upućivati na rezistentne patogene, moguće CRE, konačna identifikacija CRE potvrđuje se s pomoću fenotipskih ili molekularnih tehnika [26].

## MEHANIZMI REZISTENCIJE

Bakterije mogu imati kombinaciju više različitih mehanizama rezistencije na karbapeneme, ali najčešći je produkcija karbapenemaza. Mehanizmi rezistencije uključuju hiperekspresiju efluks pumpi i promjene u strukturi porina vanjske membrane što je čini impermeabilnom za antibiotike [26].

GNB općenito razvija otpor stvaranjem  $\beta$ -laktam-hidrolizirajućih enzima. U početku su ti enzimi inaktivirali penicilin, no kako su se različite vrste antibiotika uvodile u liječenje, njihov se spektar proširio. Tako su se pojavile cefalosporinaze, ESBL, plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze, metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL) i druge karbapenemaze [25].

Općenito, CRE se dijeli u dvije glavne podskupine: CRE koji proizvodi karbapenemazu (CP-CRE) i CRE koji ne proizvodi karbapenemazu (non-CP-CRE) [25].

## CRE KOJI PROIZVODI KARBAPENEMAZU (CRE)

Karbapenemaze su  $\beta$ -laktamaze koje hidroliziraju  $\beta$ -laktamski prsten karbapenema i drugih  $\beta$ -laktamskih antibiotika [27].

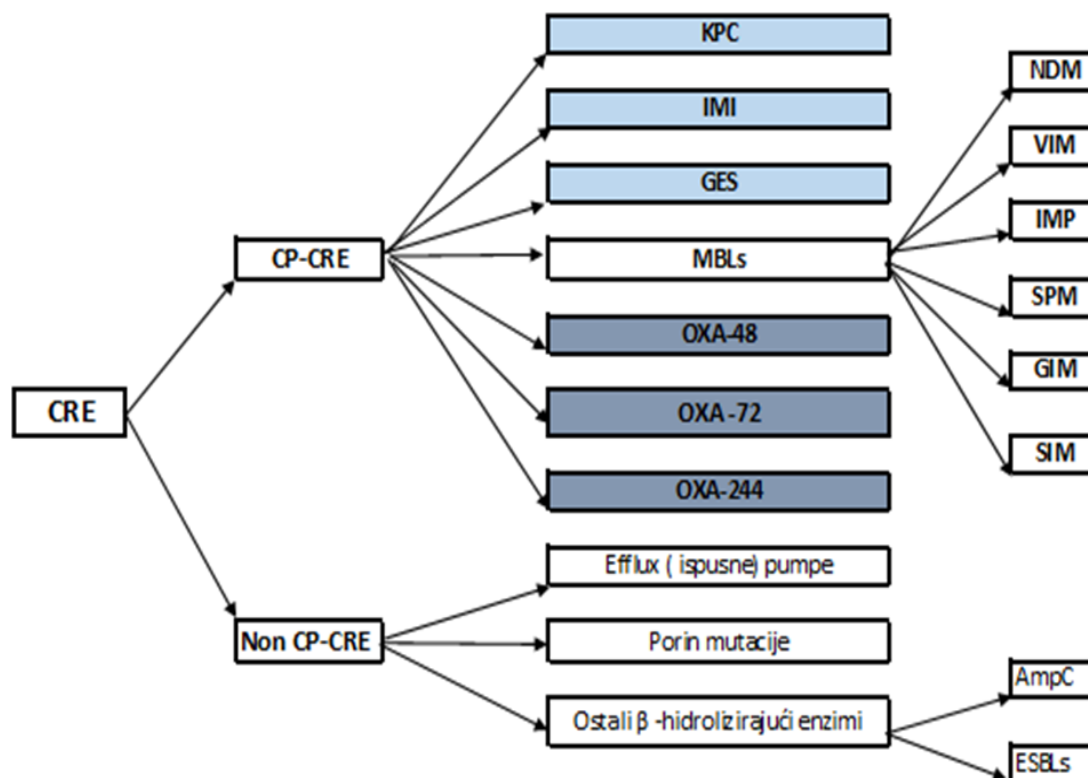
CP-CRE proizvode različite karbapenemaze koje se prema Amblerovoj klasifikaciji mogu podijeliti u tri skupine: klasa A (KPC, IMI, NMC, GES SME), klasa B koja obuhvaća metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL) i klasa D u kojoj se nalaze karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze (OXA-48, OXA-181). Postoji četvrta klasa, Ambler klasa C, međutim njezina klinička važnost ostaje nepoznata [26].

Klasa A ima širok spektar djelovanja i rabi ostatak serina na svojem aktivnom središtu tijekom cijepanja  $\beta$ -laktamskog prstena penicilina, cefalosporina, inhibitora  $\beta$ -laktamaze (sulbaktam i tazobaktam), aztreonama i karbapenema. Najveće kliničko značenje imaju KPC karbapenemaze koje su plazmidno kodirane i brzo se šire te uzrokuju hospitalne epidemije. Razgrađuju sve karbapeneme i ostale  $\beta$ -laktamske antibiotike za razliku od ostalih karbapenemaza klase A koje hidroliziraju uglavnom samo imipenem [27].

Klasa B ovisi o cinku kao sučimbenik u aktivnom središtu, ali ima sličan spektar aktivnosti kao klasa A štedeći aztreonam. Gen koji kodira MBL nalazi se u sklopu integrona koji može biti inkorporiran u plazmid ili kromosom, a sadržava i genske kasete s genima rezistencije na ne  $\beta$ -laktamske antibiotike i dezinficijense [27].

Klasa D, slično klasi A, rabi ostatak serina na svojem aktivnom mjestu, ali ima jedinstven spektar aktivnost, tj. varijabilnu osjetljivost na karbapeneme, visoku rezistenciju na penicilin i štete cefalosporine koji su obično osjetljivi osim ako soj ne proizvodi dodatnu ESBL ili AmpC  $\beta$ -laktamaz; ne djeluju na aztreonam [27].

*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase (KPC) klase A, New Delhi MBL (NDM) karbapenemaza iz klase B, oksacilin-hidrolizirajuća karbapenemaza (OXA-48 / -181) iz klase D odgovorni su za većinu rezistencija na karbapeneme u CRE. Ostale klinički važne karbapenemaze uključuju MBL-ove koji pripadaju podrazredu B1: Verona Integron-kodirani MBL (VIM) i imipenemaza (IMP). Kao karbapenemaze šireći se unutar Enterobacteriaceae javljaju se supstitucije aminokiselina koje proizvode različite inačice karbapenemaze. To rezultira promjenama u aktivnosti karbapenemaze i njegova afiniteta za karbapeneme [27].



Slika 14. Klasifikacija mehanizama rezistencije enterobakterija rezistentnih na karbapeneme Ambler klasa A, B i D [25]

Objašnjenje: Svijetlo plavo – Amber klasa A, Bijelo – Amber klasa B, Sivo – Amber klasa D

Kratice: CRE – Enterobakterije rezistentne na karbapenem, CP – proizvodi karbapenemazu, KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, IMI – Imipenemase, GES – Guiana extended-spectrum beta-lactamase, MBLs – metalo  $\beta$ -laktamase, OXA – oxasacilinaze, NDM – New Delhi metalo  $\beta$ -laktamase, VIM – Verona integron borne metalo  $\beta$ -aktamaase, IMP – imipenem rezistentni *Pseudomonas* karbapenemaza, SMP – Sao Paolo metalo  $\beta$ -laktamase, GIM – German imipenemase, SIM – Seoul imipenemase, AmpC – tip C ampicilinaze, ESBLs –  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra [25].



## CRE KOJI NE PROIZVODI KARBAPENEMAZU

Uz proizvodnju karbapenemaze *Enterobacteriaceae* imaju i alternativne mehanizme s pomoću kojih mogu uzrokovati rezistenciju na karbapenem. To su nespecifični mehanizmi koji mogu rezultirati rezistencijom na više lijekova, poput proizvodnje drugih  $\beta$ -laktamaza, gubitka porina i prekomjerne ekspresije efluks pumpe. Ti su mehanizmi obično međusobno upareni između sebe ili s proizvodnjom karbapenemaze. Zapravo, dok su karbapenemaze posebno usmjerene na karbapeneme i druge  $\beta$ -laktamske antibiotike, ekspresija efluks pumpe ili promjene porina povezane su s rezistencijom na više lijekova. Sva tri alternativna mehanizma imaju za cilj blokirati prodor antibiotika unutar bakterijske stanice. Prvo, *Enterobacteriaceae* mogu proizvesti različite vrste  $\beta$ -laktamaza, poput  $\beta$ -laktamaza tipa AmpC. Ti enzimi ne razgrađuju karbapeneme, ali tvore vezu s molekulom karbapenema sprečavajući joj pristup cilju. Točnije, plazmidom kodirani AmpC CMY-2 često se nalazi u *E.coli* i drugim enterobakterijama diljem svijeta, što uzrokuje rezistenciju na karbapeneme. Drugo, efluks pumpe s otporom – nodulacijskim dijeljenjem (RND) glavni su mehanizam rezistencije na više lijekova u *Enterobacteriaceae*. Među različitim sustavima otjecanja najčešći je sustav AcrAB-TolC RND. Ova RND ispusna pumpa s CusABC izljevničkim kompleksom pripada *E. coli*. Slično tomu, *Campylobacter jejuni* stječe rezistenciju na više lijekova s pomoću ekspresije CmeABC kompleksa. Ovi geni rezistencije mogu se lako prenijeti s jedne bakterije na drugu preko plazmida. Promjene sinteze porina uzrokuju impermeabilnost pa karbapenemi ne mogu ući u bakterijsku stanicu. Te su promjene opisane u *K. pneumoniae* koja proizvodi AmpC i karbapenemazu, što sugerira da promjene u ekspresiji porina igraju ključnu ulogu u rezistenciji na  $\beta$ -laktam koje pokazuju MDR bakterije [25].

GNB ima staničnu stijenku i staničnu membranu te tako kontrolira koje molekule prolaze kroz njegovu vanjsku membranu. Ovaj zid/membrana znači da velike molekule karbapenema zahtijevaju transport u bakterijski intermembranski prostor preko porinskih kanala. Dakle, porinski kanali mogu djelovati kao filter koji sprječava karbapeneme da dođu do mjesta djelovanja. Efluks pumpe rade na ovom prostoru kako bi uklonile nepravilne ili neprijateljske molekule i antibiotike, dodatno regulirajući intramembransko okruženje. Većina mehanizama rezistencije koji nisu cpCRE djeluju na ovom prostoru kako bi spriječili razgradnju obrambenih stanica bez proizvodnje karbapenem specifične  $\beta$ -laktamaze [26].

Fenotipska dijagnoza zahtijeva uzgoj i identifikaciju bakterija. Provodi se testiranje osjetljivosti disk difuzijskim ili dilucijskim testom ili automatsko ispitivanje osjetljivosti kako bi se identificirao fenotip rezistencije na karbapenem. Navođenjem referentnih točaka MIK moguća je konačna dijagnoza rezistencije na karbapenem. Nedostatci ovog postupka uključuju odgođenu dijagnozu i ograničene informacije o određenim mehanizmima rezistencije. Molekularna identifikacija mnogo je brža (mjeri se u satima umjesto danima) i može brzo odrediti vrstu mehanizma rezistencije. Međutim, ova metoda jednostavno upućuje na prisutnost gena rezistencije i možda neće odrediti učinkovitost specifičnih antibiotika. Rano otkrivanje CRE infekcija pomaže poboljšati liječenje i smanjiti vjerojatnost širenja infekcije. Najčešći način detekcije jest PCR [26].

Matrično potpomognuta laserska desorpcija (MALDI-TOF) najnovija je tehnologija primijenjena na identifikaciju CRE. Ova se tehnika koristi laserskom ionizacijom bakterijskih proteina za stvaranje proteomskog profila. Pojedinačne informacije o  $\beta$ -laktamazi i metalo- $\beta$ -laktamazi ekstrahiraju se iz profila kako bi se utvrdio CRE status. Dokazano je da ova metoda ima 98,9%, odnosno 97,1% osjetljivosti i specifičnosti [26].

Tablica 6. *Enterobacteriaceae*; antimikrobne kategorije i agensi koji se rabe za definiranje MDR, XDR i PDR [15]

ANTIMIKROBNA KATEGORIJA	ANTIMIKROBNO SREDSTVO
Aminoglikozidi	gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin
Anti-MRSA Cefalosporini	ceftaroline (odobrena samo za <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> )
Karbapenemi	ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem
Cefalosporini; 1. i 2. generacija Cefalosporina	cefazolin, cefuroxime
Cefalosporini proširenog spektra, 3. i 4. generacija Cefalosporina	ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefepime
Cephameycins	cefoxitin, cefotetan
Glycylcyclines	tigeciklin
Fluorokinoloni	ciprofloksacin
Antipseudomonasni penicilini + inhibitori β-laktamaze	ticarcillin-klavulanska kiselina piperacillin-tazobactam
Inhibitori folne kiseline	trimetoprim-sulfametoksazol
Penicilini + inhibitori β-laktamaze	amoxicillin-klavulanska kiselina ampicilin-sulbaktam
Polimiksini	kolistin
Monobaktami	aztreonam
Penicilini	ampicillin
Fenikoli	chloramphenicol
Tetraciklini	tetraciklin, doksciklin, minocycline
<p><b>Kriteriji za definiranje MDR, XDR i PDR kod <i>Enterobacteriaceae</i>:</b>  <b>MDR neosjetljiv na jedno sredstvo u tri antimikrobne kategorije.</b>  <b>XDR: nije osjetljiv najedno sredstvo u svim kategorijama osim u dvije.</b>  <b>PDR: nije osjetljiv na sva navedena antimikrobna sredstva.</b></p>	

Tablica 7. Važna intrinzična rezistencija na lijekove [26]

<b>ANTIBIOTIK</b>	<b>REZISTENTNA BAKTERIJA</b>
Polymixin	<i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>
Tigecycline	<i>Pseudomonas</i>
Nitrofurantoin	<i>Proteus spp</i>
Ertapenem	<i>Pseudomonas</i>
Prirodni semisintetski penicilini, kombinacije s inhibitorima $\beta$ -laktamaza, 1.i 2. generacija cefalosporina	<i>Enterobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>A. baumannii</i>

## LIJEČENJE

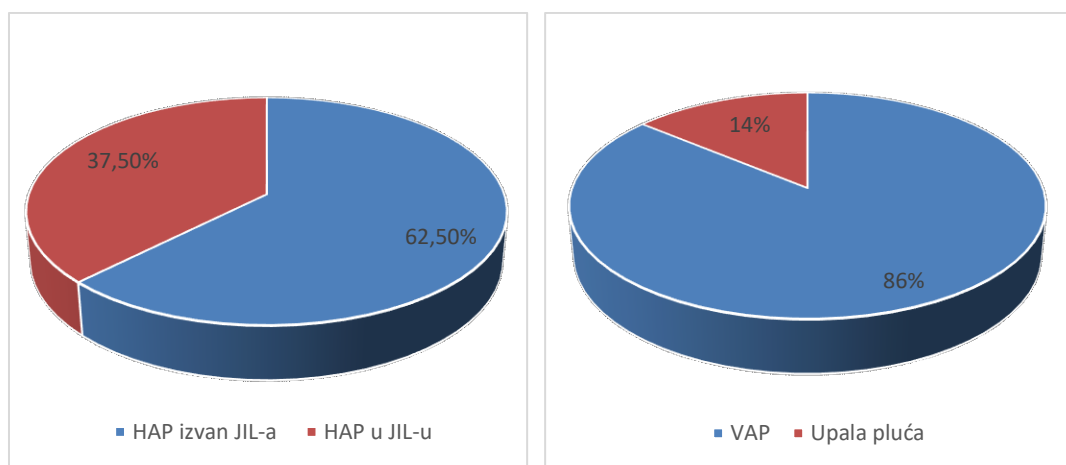
Liječenje CRE ovisi o mjestu infekcije, izoliranom patogenu te profilu rezistencije (Tablica 6., 7.). Antibiotici koji mogu djelovati protiv CRE izolata uključuju karbapeneme, polimiksine, aminoglikozide, tigecklin, fosfomicin i inhibitore  $\beta$ -laktamaza/ $\beta$ -laktamaze (BLBLI). Dokazano je da kombinirana terapija s više nepovezanih antimikrobnih sredstava smanjuje smrtnost u okruženju visokog rizika, gdje je vjerojatan smrtni ishod. To je najbolje vidljivo pri infekciji krvi (BSI) i septičkog šoka kod patogena koji proizvode karbapenemazu klase A. Tipično je liječenje usredotočeno na polimiksinu zajedno s drugim ciljanim antibioticima (Tablica 8.). Ovi se podaci temelje na metaanalizi različitih terapija za infekcije uzrokovane CRE sojevima, koje su pokazale nižu smrtnost pri liječenju temeljenom na polimiksinu, a istraživači su pronašli sinergiju između trostruke kombinacije polimiksina, karbapenema i rifampicina ili tigecklina. Ondje gdje je dostupan, fosfomicin je također pokazao povećanu učinkovitost pri CRE infekcijama i može se uzeti u obzir u trostrukoj terapiji. U teoriji, karbapenemi (idealno s  $MIK < 16$ ) mogu imati određenu aktivnost kad se rabe u kombinaciji s antibioticima različitih mehanizama [26].

Tablica 8. Mogući protokoli liječenja visokorizičnih infekcija [26]

MEHANIZAM REZISTENCIJE	TERAPIJA			
	PRVI IZBOR	DRUGI IZBOR	TREĆI IZBOR	ČETVRTI IZBOR
Karbapenem rezistencija	polymixin	carbapenem	rifampicin tigecycline fosfomicin	
	tigecycline	aminoglikozidi	tigecycline	
PDR	meropenem	ertapenem	ceftazidim- avibactam	aztreonam

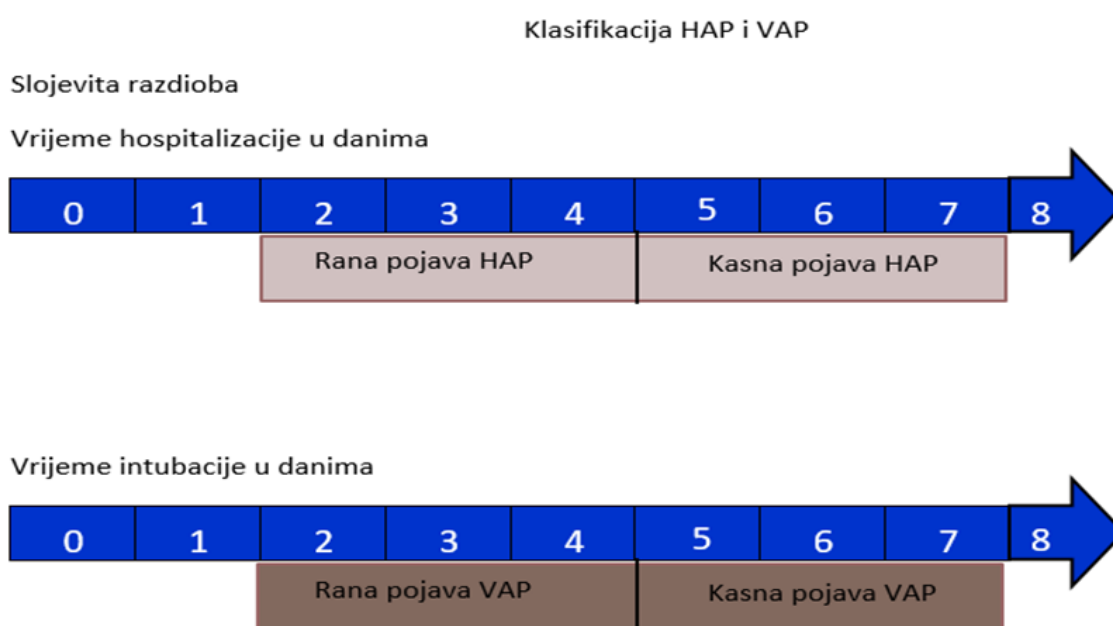
### 1.5. Ventilatorom prouzročena upala pluća (VAP)

Pneumonija stečena u bolnici (HAP) jest infekcija plućnog parenhima uzrokovana mikroorganizmima prisutnim u bolničkom okruženju koja se pojavljuje 48 ili više sati nakon prijma u bolnicu. Ventilatorom prouzročena upala pluća (VAP) jedan je od oblika HAP, a definirana je kao upala pluća koja se javlja u bolesnika koji su na mehaničkoj ventilaciji (MV) dulje od 48 sati. HAP i VAP ubrajaju se u najčešće komplikacije tijekom liječenja na mehaničkoj ventilaciji i iskazuju najveću stopu smrtnosti među bolničkim infekcijama [28].



Slika 15. i 16. Pneumonija stečena u bolnici (HAP) / ventilatorom prouzročena upala pluća (VAP) [28]

S obzirom na vrijeme nastanka, VAP se može podijeliti na rani i kasni VAP. VAP koji se razvije unutar četiri dana od početka mehaničke ventilacije definiran je kao VAP s ranim početkom koji obično uzrokuju mikroorganizmi osjetljivi na antibiotike. To su obično tipični izvanbolnički patogeni, kao što su *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis* ili *E. coli*. VAP koji se javlja više od četiri dana od početka mehaničke ventilacije definiran je kao VAP s kasnim početkom koji je najčešće povezan s MDR patogenima i povezani su s većom smrtnošću. VAP s kasnim početkom najčešće uzrokuju *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ili *A.baumannii* [29][30].



Slika 17. Klasifikacija HAP/VAP [31]

Najveći rizik od VAP je tijekom prvih deset dana nakon intubacije. VAP se javlja u 9 do 27% slučajeva liječenja bolesnika na mehaničkoj ventilaciji, od čega više u nerazvijenim zemljama koje prema razvijenim zemalja nemaju dobre preventivne strategije [31]. Iako je smrtnost kod VAP između 20% i 50%, zbog uglavnom velikog broja pridruženih komorbiditeta smrtnost se procjenjuje na 13% [32].

Tablica 9. Patogeni koje treba uzeti u obzir tijekom liječenja HAP/VAP [29][30]

	<b>RANI HAP/VAP</b>	<b>KASNI HAP/VAP</b>
<b>VRIJEME</b>	do 5 dana od primitka ili početka mehaničke ventilacije	5 dana ili više od primitka ili od početka mehaničke ventilacije
<b>UZROČNICI</b>	<i>S.pneumoniae</i> <i>H.influenzae</i> <i>S.aureus</i> Gram-negativne osjetljive bakterije	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumannii</i> MRSA drugi MDR
<b>PROGNOZA</b>	manje ozbiljan mali utjecaj na ishod, smrtnost minimalna	veća smrtnost i morbiditet

Etiologija VAP je promjenjiva i ovisi o vremenu koje je proteklo od početka mehaničke ventilacije, duljini hospitalizacije i invazivnim postupcima. Najčešći uzročnici VAP su GNB (*E. coli* 5,9%, *K. pneumoniae* 10,1%, *Enterobacter spp* 8,16%, *P. aeruginosa* 16,6%, *Acinetobacter spp* 6,6%) te gram-pozitivne bakterije (*S. aureus* 24,1%) [32].

Tablica 10. Mikrobiološki uzročnici HAP/VAP [28]



MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOZA		UČESTALOST IZOLACIJE (% UBOLESNIKA)
Gram-negativne bakterije	<i>E. coli</i> <i>K. species</i> <i>Enterobacter species</i> <i>Proteus species</i> <i>Serratia marcesens</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. species</i> <i>S. maltophilia</i>	35 – 80
Gram-pozitivni koki	<i>S. pneumoniae</i> <i>Streptococcus species</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA i MRSA)	9 – 46
Više bakterija		9 – 80
Anaerobi		0 – 54
Pozitivne hemokulture		0 – 40
Nema bakterija		2 – 54



## KLINIČKA DIJAGNOZA

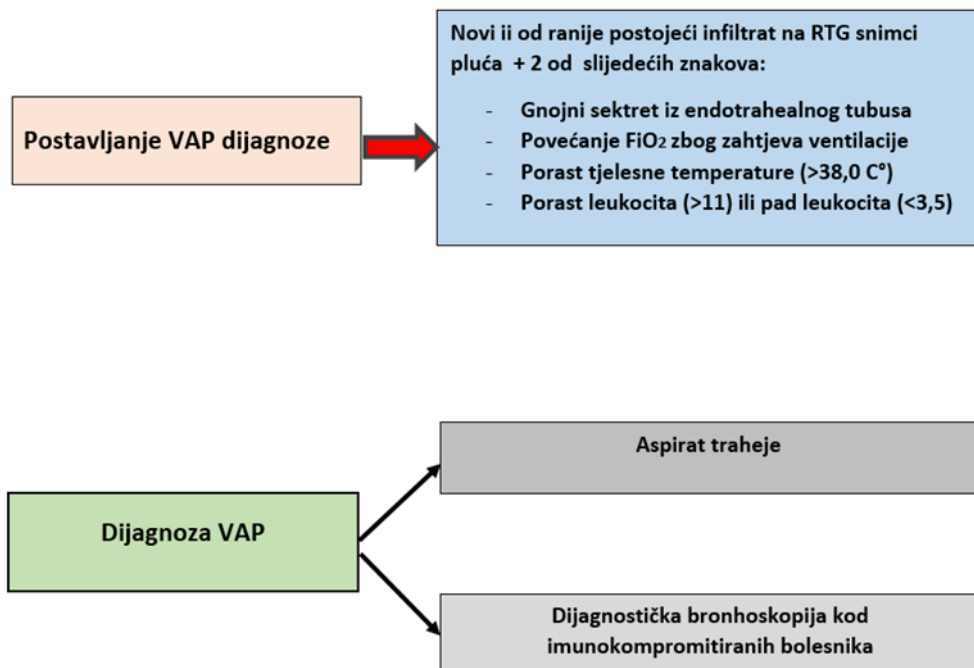
Dijagnoza VAP je neinvazivna i ne zahtijeva posebno znanje ili specijaliziranu opremu. Jednako tako VAP je teško prepoznati i samim time pravilno pravodobno liječiti. Do VAP dolazi isključivo u JIL i 86% bolničkih pneumonija koje su zapravo pneumonije dobivene tijekom liječenja na mehaničkoj ventilaciji, odnosno VAP. Na temelju kliničkih kriterija, kako bi se utvrdila dijagnoza VAP, trebaju biti zadovoljena najmanje dva od tri klinička kriterija: povišena/visoka tjelesna temperatura (odnosno porast tjelesne temperature od najmanje 1°C ili izmjerena tjelesna temperatura veća od 38,3°C), leukocitoza (povećanje od 25% ili vrijednost veća od  $10,0 \times 10^9/L$ ), leukopenija (smanjenje od 25% ili vrijednost manja od  $5,0 \times 10^9/L$ ), gnojna respiratorna sekrecija [33].

## Postavljanje dijagnoze VAP

Klinička slika	RTG snimka pluća	Mikrobiološki nalaz
Gnojni sekret	<i>Infiltrat na plućima</i> 	<i>Patogeni mikroorganizam</i> 
Povećana potreba za kisikom		
Tjelesna temperatura >38°C		
Leukociti <3,5 ili >11,0		

Slika 18. Postavljanje dijagnoze VAP-a [33]

Također bolesnik mora imati barem jedan od sljedećih kriterija: novi početak gnojnog iskašljaja ili promjenu obilježja ispljuvka, mikroorganizam izoliran iz krvi ili iz uzorka dobivenog aspiratom iz traheje, bronhoalveolarnim ispiranjem ili bronhijalnim četkanjem ili biopsijom [28].



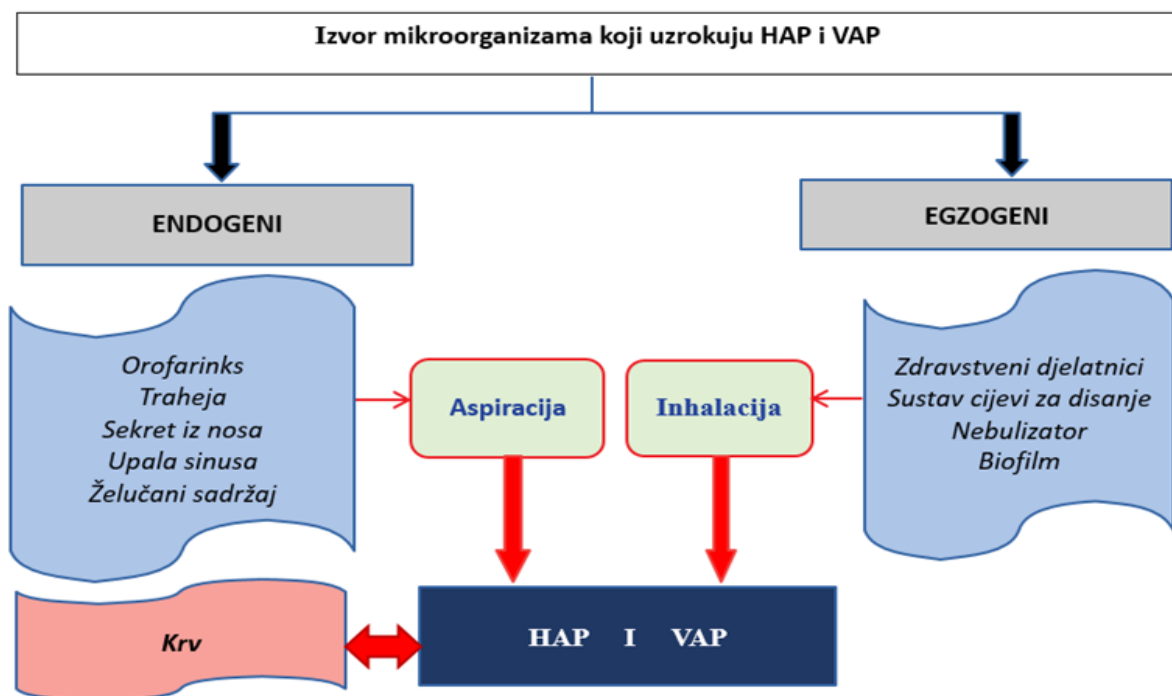
Slika 19. Postavljanje dijagnoze VAP [30]



Slika 20. Uzorkovanje mikrobioloških uzoraka za dijagnozu VAP [28]

## ČIMBENICI RIZIKA

Kako bi se smanjila učestalost VAP i unaprijedilo liječenje bolesnika na mehaničkoj ventilaciji, potrebno je razjasniti čimbenike rizika kod VAP koji se dijele u dvije skupine: čimbenici rizika koji su određeni stanjem domaćina i čimbenici rizika koji su povezani sa samim liječenjem. Čimbenici povezani s domaćinom su povijest bolesti, spol, starost, neurološki poremećaji i komorbiditeti poput akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS), kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB), ulkusne bolesti, zatajenja organa i imunosupresije. Čimbenici koji se odnose na ventilaciju obično uključuju trajanje mehaničke ventilacije, reintubaciju, odsutnost subglotične aspiracije, nazogastričnu sondu, traheostomiju, tlak u *cuffu* endotrahealnog tubusa manji od 20 cm H<sub>2</sub>O te prethodna intravenozna upotreba antibiotika (unutar posljednjih 90 dana). Definiranjem čimbenika rizika olakšava se razvoj strategija za prevenciju VAP kao i razvoj novih tehnika liječenja [34].



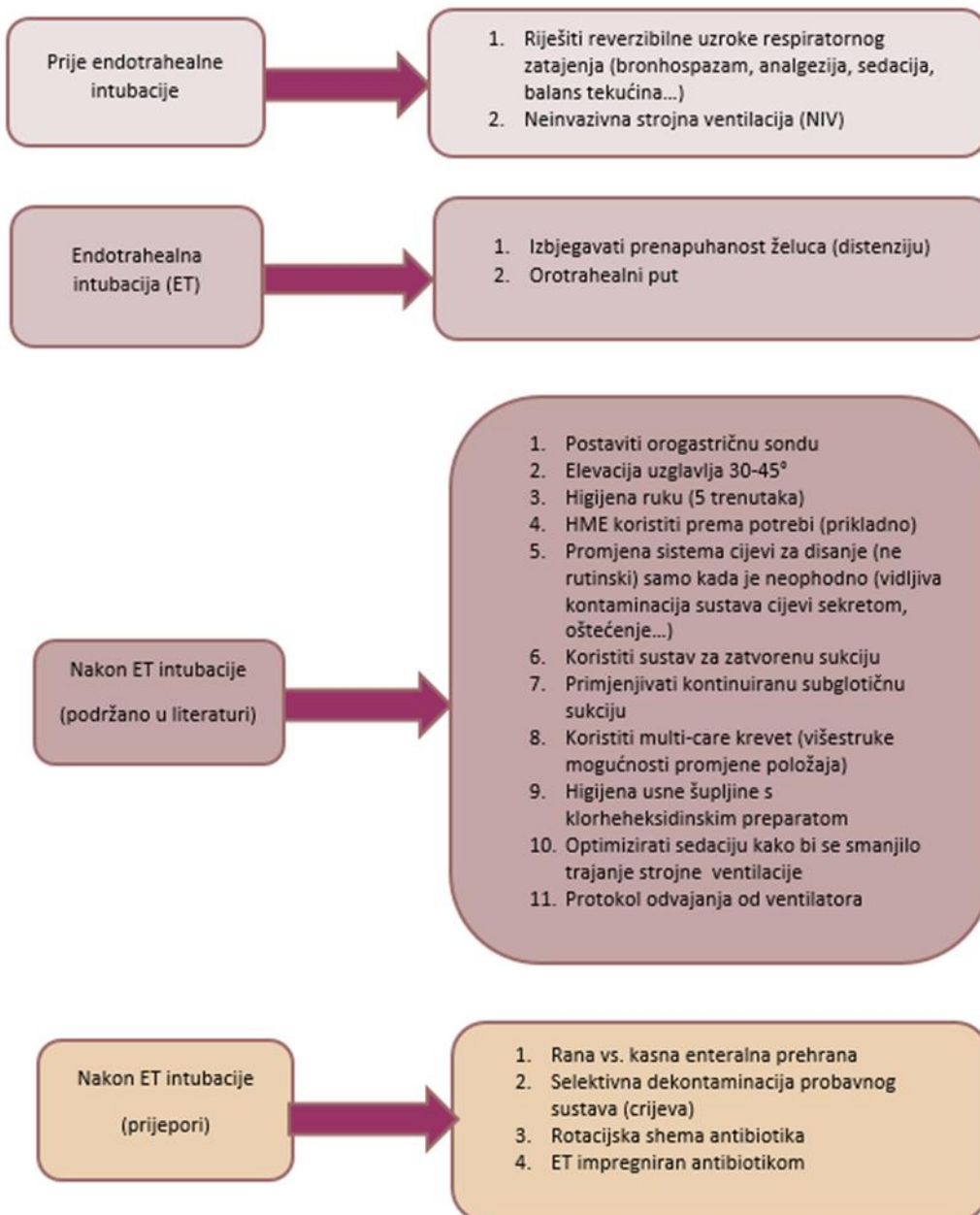
Slika 21. Izvor mikroorganizama koji uzrokuju HAP i VAP [28]

## MJERE PREVENCIJE

Preventivne mjere za VAP usmjerene su na smanjenje izloženosti ventilatoru, intenzivnu oralnu njegu uporabom 2-postotnog klorheksidina te osiguravanje udobnosti i pravilne njege bolesnika [28] [35].

Mjere prevencije VAP [28][35]:

- povećanje učinkovitosti kontrole infekcija u svim institucijama,
- oralna intubacija,
- održavanje optimalnog položaja (poluležeći položaj pod kutom od 30° do 45°) i poticanje mobilnosti
- intenzivna oralna njega (klorheksidin),
- smanjenje izloženosti ventilatoru,
- aspiracija subglotičnog sekreta,
- upotreba zatvorenih sustava aspiracije [28][35].

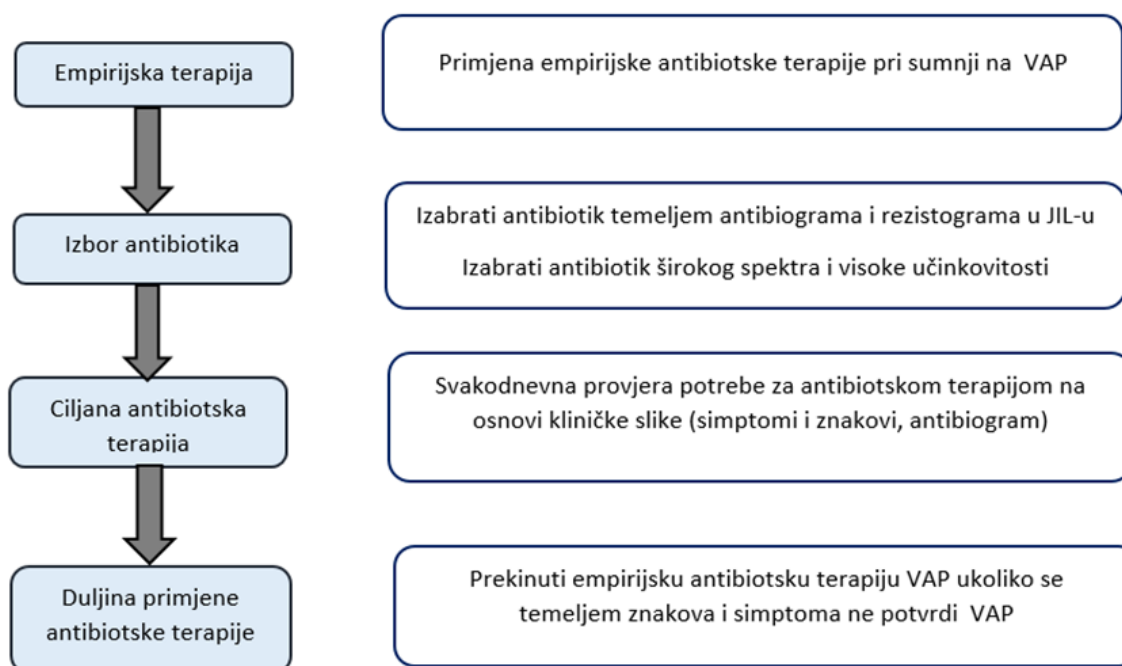


Slika 22. Prevencija nastanka VAP [28][35]

## LIJEČENJE VAP

Prevenција i liječenje VAP ovisi o odgovarajućoj antimikrobnoj terapiji koju treba odabrati na temelju prethodne antibiotske terapije, povijesti hospitalizacije ili mehaničke ventilacije, obrasca bakterijskih patogena i rezistencije na antibiotike. Empirijske strategije liječenja VAP ovise o lokalnoj distribuciji patogena i njihovoj antimikrobnoj osjetljivosti. Pravovremena primjena pravilne antimikrobne terapije izravno je povezana sa smanjenom stopom smrtnosti [33]. Da bi se poboljšala takva diferencijacija u bolesnika s upalom pluća prouzročena ventilatorom, proučavaju se biomarkeri u kombinaciji s kliničkim i mikrobiološkim čimbenicima. Proučavani biomarkeri uključuju prokalcitonin, C-reaktivni protein i topivi pokretački receptor eksprimiran na mijeloidnim stanicama (sTREM-1) [17].

Nakon postavljanja dijagnoze upale pluća empirijsku antibiotsku terapiju potrebno je prilagoditi mikrobiološkoj ekologiji bolničke ustanove i duljini vremena provedenoga u bolničkoj ustanovi prije razvoja upale pluća. Sve veći broj dokaza sugerira da rana, odgovarajuća antibiotska terapija poboljšava ishode i takva bi terapija trebala biti cilj; međutim, ovu strategiju treba povezati s ranom ponovnom procjenom dijagnoze i terapije u roku od 48 do 72 sata. U većini slučajeva empirijska se terapija može zamijeniti ciljanom antibiotskom terapijom zasnovanoj na rezultatima respiratornih kultura ili čak prekinuti ako se utvrdi alternativna dijagnoza [17].



Slika 23. Liječenje VAP [17][33]

## 1.6. Oralna higijena

Jedan od glavnih uzroka VAP jest kolonizacija i mikroaspiracija orofaringealnog sekreta nakon formiranja zubnog plaka, što je posljedica loše oralne higijene i nemogućnosti mehaničkog uklanjanja mikroorganizama iz zubnog plaka. Razvojem rezistencije na antibiotike posljednjih nekoliko desetljeća uvelike je ograničena upotreba antibiotika. Zato je jedna od vodećih preventivnih mjera VAP intenzivna oralna higijena kako bi se spriječio rast zubnog plaka i tako spriječile infekcije. U oralnoj higijeni kao važna mjera prevencije VAP najčešće se rabi klorheksidin s obzirom na to da se mnogobrojnim provedenim istraživanjima pokazao najučinkovitijim za spomenutu primjenu [8]. Klorheksidin je antiseptičko sredstvo širokog spektra djelovanja (djeluje na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije) uporabom kojeg se može smanjiti učestalost VAP kad se rabi za oralnu njegu [36].

Tri metode oralne higijene koriste se za uklanjanje zubnog plaka i bakterija iz usne šupljine u mehanički ventiliranih bolesnika:

- mehanička intervencija (četkanje zuba i ispiranje usta)
- farmakološka intervencija (primjena antiseptičkih sredstava)
- mješovite intervencije (kombiniraju obje metode).

Mehaničko čišćenje četkanjem zuba pokazalo se najučinkovitijom metodom uklanjanja svih patogena iz plaka [8].

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **2.1. Ciljevi**

1. Odrediti imaju li bolesnici kolonizirani gram-negativnim bakterijama u usnoj šupljini veći rizik za razvoj pneumonije od onih koji nisu kolonizirani gram-negativnim bakterijama.
2. Odrediti utječe li fenotip rezistencije na antibiotike na potrebu za promjenom antibiotika (*switch*).
3. Odrediti utjecaj fenotipa rezistencije na uspjeh odabira empirijske terapije.
4. Molekularno detektirati gene rezistencije.
5. Ispitati osjetljivost kulture obriska usne šupljine kao prediktora kolonizacije donjeg dišnog sustava gram-negativnim bakterijama.

### **2.2. Hipoteze**

1. Bolesnici kolonizirani gram-negativnim bakterijama u usnoj šupljini imaju veći rizik za razvoj VAP.
2. Antibiotici širokog spektra (cefuroksim, cefazolin) više selekcioniraju gram-negativne bakterije u usnoj šupljini u odnosu prema antibioticima uskog spektra (ceftriakson, vankomicin, linezolid).
3. Nalaz kulture obriska usne šupljine bit će istovjetan nalazu kulture trahealnog aspirata.



### 3. MATERIJALI I POSTUPCI/ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. Protokol

Brisevi usne šupljine i endotrahealni aspirati uzimali su se u bolesnika koji su na mehaničkoj ventilaciji, a uvedena im je kirurška antibiotska profilaksa (ciprofloksacin i metronidazol ili cefazolin i metronidazol).

Bris usne šupljine uzimala je educirana prvostupnica sestrinstva na sljedeći način: sterilnom drvenom špatulom pritisnut je jezik i laganom rotacijom štapića izvađenoga iz originalnog sterilnog kompleta duljine 15 cm obloženog vatom (bris), proizvođača Nerbe plus, uz pritisak se kružnim pokretima obrisala usna šupljina. Bris se pohranio u sterilno originalno pakiranje. Uzorak je označen na sljedeći način: ime i prezime bolesnika, datum i godina rođenja, datum uzimanja, odjel i vrsta uzorka (bris usne šupljine). Uzorak je odmah dostavljen u mikrobiološki laboratorij; ako ga nije bilo moguće dostaviti u mikrobiološki laboratorij, bris je pohranjen u hladnjak na +4 °C i u roku od 8 sati dostavljen je u mikrobiološki laboratorij. Prvi uzorci briseva usne šupljine uzimali su se prije uvođenja antibiotske terapije, a drugi uzorci peti dan nakon uvođenja antibiotske terapije.

Endotrahealne aspirate uzimala je educirana prvostupnica sestrinstva na sljedeći način: sterilni sukcijski kateter s mukoznim ekstraktorom, proizvođača Covidien, *Argyle* se uvodio kroz endotrahealni tubus na dubini od 25 cm, nakon aspiracije kateter se izvlačio kroz endotrachelani tubus. Fiziološka otopina injicirala se sterilnom špricom kako bi se isprao eksudat u sterilnu posudicu. Uzorak je označen na sljedeći način: ime i prezime bolesnika, datum i godina rođenja, datum uzimanja, odjel i vrsta uzorka (endotrahealni aspirat). Uzorak je odmah dostavljen u mikrobiološki laboratorij. Uzorak je podvrgnut bojenju prema Gramu i metilenskim modrilom. Deset ml uzorka zasijano je na krvni i MacConceyev agar za kvantitativnu analizu. Samo su gram-negativne bakterije u količini većoj od  $10^5$  dalje analizirane. Bakterije su identificirane konvencionalnim biokemijskim testovima i metodom MALDI-TOF. Porast mikroorganizama ispod prijelomne vrijednosti smatran je kontaminacijom ili kolonizacijom. Endotrahealni aspirati uzimali su se tako da se prvi uzorak uzimao unutar prvih pet dana od početka mehaničke ventilacije, a drugi nakon pet dana od početka mehaničke ventilacije.

U svrhu dobivanja informiranog pristanka bolesnika primijenjen je obrazac informiranog pristanka Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje: Objašnjenje i pisani pristanak za anesteziju i intenzivno liječenje.

Podaci koji su se rabili/prikupljali tijekom istraživanja:

1. prikupljeni su demografski podaci o bolesnicima iz bolničkog računalnog sustava (BIS) uključujući dob, spol, dijagnozu, profilaksu i terapiju antibioticima te ishod liječenja,
2. određena je osjetljivost bakterija na antibiotike,
3. dokazane su  $\beta$ -laktamaze fenotipskim testovima,
4. detektirani su geni rezistencije metodom PCR,
5. određena je prenosivost rezistencije metodom konjugacije u bujonu,
6. utvrđeno je postoji li statistički važna razlika u mortalitetu, duljini boravka u bolnici i stopi komplikacija između bolesnika koji su kolonizirani gram-negativnim bakterijama u usnoj šupljini i onih koji nisu.

### **3.2. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 225 bolesnika na mehaničkoj ventilaciji te uvedenoj kirurškoj antibiotskoj profilaksi. Bolesnici su zaprimljeni u jedinicu intenzivnog liječenja kirurških bolesnika (AIK), jedinicu intenzivnog liječenja kardiokirurških i vaskularnih bolesnika (AKA) te jedinicu intenzivnog liječenja neurokirurških bolesnika (AIN) nakon elektivnih i hitnih operativnih zahvata.

Prema protokolima primijenjenim u kirurškim jedinicama intenzivnog liječenja, KBC Zagreb, bolesnici su primali antibiotike tijekom 24 sata. Prva doza primijenjena je sat vremena prije operacije i za elektivne i za hitne kirurške zahvate. Kardiokirurški i neurokirurški bolesnici primili su samo jednu dozu antibiotika, kirurški bolesnici dobili su dvije ili tri doze, ovisno o postupku. Bolesnici su primljeni u JIL odmah nakon planiranih ili hitnih operacija. Profilaksa u AIK temelji se na primjeni cefazolina i metronidazola ili ciprofloksacina i metronidazola, u AIN cefazolina ili ceftriaksona, dok se u AKA rabi cefuroksim. Izbor antibiotika bio je u skladu s Hrvatskim nacionalnim smjernicama [72] s konkretnim preporukama ovisno o bolnici, vrsti bolesnika i postupcima u svakom JIL. Ceftriakson se općenito ne preporučuje za profilaksu prema hrvatskim smjernicama, ali se rabi u neurokirurškom JIL zbog visoke aktivnosti prema gram-negativnim patogenima povezanim s postoperativnim meningitisom i zbog visokih

koncentracija u likvoru. Vankomicin se rabi samo za bolesnike koji su već bili u bolnici ili su došli iz doma za starije ili nemoćne ili su prije imali izolat MRSA. Slično, meropenem se rabi u slučaju kad su bolesnici imali ESBL pozitivan mikroorganizam u posljednja tri mjeseca.

Empirijska terapija antibioticima je produljena u slučajevima pojave infekcije ili je promijenjena u skladu s rezultatima antibiograma.

Kod svih bolesnika uzeti su brisevi usne šupljine i endotrahealni aspirati prema navedenom protokolu.

Mjereni podaci isključivo su upotrijebljeni u svrhu istraživanja. Pristup podacima (u kojima nije navedeno ime i prezime ispitanika ni bilo kakav drugi podatak koji bi se mogao povezati s ispitanikom) imali su samo autor i statističar koji je radio statističku obradu podataka. Dobiveni rezultati prezentirani su skupno u sklopu pisanja i prezentacije doktorskog rada užoj javnosti i objave rada u časopisu.

### **3.3. Laboratorijska karakterizacija izolata**

#### **3.3.1. Testiranje osjetljivosti na antibiotike**

Testiranje osjetljivosti na velik broj različitih antibiotika ovisno o vrsti bakterije radilo se disk difuzijskom metodom i bujonskom mikrodilucijskom metodom u Mueller-Hinton(MH) agaru i mikrotitar pločicama prema CLSI interpretirani su prema smjernicama CLSI prijelomnim točkama objavljenima 2016. godine. U provjeri točnosti testiranja korišteni su kontrolni sojevi: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 kao preporučeni standardni kontrolni sojevi prema CLSI [37].

### **3.3.2. Fenotipska detekcija $\beta$ -laktamaza**

#### **3.3.2.1. Metoda dvostrukog diska**

Prekonoćna kultura testiranog soja razrjeđuje se tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5 što odgovara za  $10^8$  CFU/ml. To se razrjeđenje zasijavana MH agar i zatim se postavljaju diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona, cefepima i aztreonama. U sredinu ploče postavlja se disk ko-amoksiklava kao izvor klavulanske kiseline na udaljenosti od 2 do 3 cm od perifernih diskova. Ploče se inkubiraju 18 do 24 h na 35 do 37 °C. Deformacija inhibicijske zone oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama u smjeru prema centralnom disku s klavulanskom kiselinom znači pozitivan rezultat i upućujena produkciju ESBL[38].

#### **3.3.2.2. Metoda kombiniranih diskova**

Prekonoćna kultura testiranog soja razrjeđuje se tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5 što odgovara za  $10^8$  CFU/ml. To se razrjeđenje zasijava na MH agar i zatim se postavljaju po dva diska ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama, jedan bez, a drugi s dodatkom klavulanske kiseline (10 000 mg/ml). Ako je inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu prema kontrolnom disku bez klavulanske kiseline, to upućuje na produkciju ESBL [37].

#### **3.3.2.3. Detekcija AmpC $\beta$ -laktamaza**

Kao *screening* metoda za detekciju plazmidnih AmpC  $\beta$ -laktamaza može se rabiti dilucijska i difuzijska metoda. U dilucijskoj metodi pripremamo dvostruka serijska razrjeđenja cefoksitina u MH agaru s dodatkom fiksne koncentracije kloksacilina i bez nje (100 mg/l) tako da se dobije raspon koncentracija antibiotika od 0,12 do 256 mg/l. Izolati koji pokazu smanjenje MIK cefoksitina za četiri ili više razrjeđenja uz dodatak kloksacilina smatraju se vjerojatnim producentima AmpC  $\beta$ -laktamaze [38].

U difuzijskom testu nanosimo na površinu MH agara testirani izolat i nakon toga stavljamo disk cefoksitina s dodatkom 10  $\mu$ l fenil-boronične kiseline (20 mg/ml) i bez dodatka. Uvećanje inhibicijske zone oko cefoksitinskog diska za 5 mm je suspektno na produkciju AmpC  $\beta$ -laktamaze. Difuzijski test za detekciju ampC  $\beta$ -laktamaza može se izvoditi i tako da se kloksacilin dodaje u podlogu (MH agar) u koncentraciji od 100 mg/l. Uvećanje inhibicijske zone oko cefoksitinskog diska za 5 mm na podlozi koja sadržava kloksacilin u odnosu prema kontrolnoj ploči bez kloksacilina je suspektno na produkciju Amp C  $\beta$ -laktamaze [37].

#### **3.3.2.4. Detekcija karbapenemaza modificiranim Hodgeovim testom**

Referentni soj *E. coli* ATCC25922 u obliku suspenzije gustoće od 0,5 prema McFarlandu zasijava se na površinu MH agara i testirani se soj zasijava u obliku crte od centra prema periferiji ploče. Nakon stajanja 15 min na sobnoj temperaturi u sredinu ploče stavlja se disk imipenema od 10  $\mu$ g i ploča se inkubira preko noći. Deformacija inhibicijske zone oko diska imipenema u obliku lista djeteline upućuje na hidrolizu karbapenema [39].

#### **3.3.2.5. E test MBL za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza**

Prekonoćna kultura testiranog soja razrjeđuje se tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5 što odgovara za 10<sup>8</sup> CFU/ml. To se razrjeđenje zasijava na MH agar i zatim se postavljaju po dva diska meropenema i imipenema, jedan bez, a drugi s dodatkom EDTA (0,5 mmol). Ako je inhibicijska zona oko diskova karbapenema uz dodatak EDTA veća za više od 7 mm u odnosu kontrolni disku bez EDTA, to upućuje na produkciju metalo- $\beta$ -laktamaza [40].

#### **3.3.2.6. Metoda kombiniranih diskova za detekciju karbapenemaza**

Izolati enterobakterija testirani su na produkciju karbapenemaza uporabom četiriju diska imipenema ili meropenema: jedan sam, drugi uz dodatak 3-amino-fenilboronične kiseline za detekciju KPC  $\beta$ -laktamaza (20 mg/ml), treći uz dodatak EDTA (0.5 mmol) za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza i četvrti uz dodatak 3-amino-fenilboronične kiseline i EDTA za detekciju simultane produkcije KPC i metalo- $\beta$ -laktamaza. Uvećanje inhibicijske zone za najmanje 5 mm

uz prisustvo odgovarajućeg inhibitora u odnosu prema kontrolnom disku upućuje na produkciju karbapenemaze [41].

### 3.3.2.7. Konjugacija

Prijenos rezistencije na koamoksiklav testiran je metodom konjugacije u bujonu (broth mating method). Kao recipijent uzet je soj *Escherichia coli* A15R<sup>r</sup> rezistentan na natrijev azid. Donori i recipijent soj zasijani su u srčano-moždani infuzijski bujon, inkubirani 4 – 6 h (do kasne ekspanzionalne faze) i zatim inokulirani u omjeru 1:2 u 5 ml srčano-moždanog infuzijskog bujona. Transkonjuganti su selekcionirani na McConkeyevu agaru koji sadržava meropenem (2 mg/l) i natrijev-azid (100 mg/l) [42].

### 3.3.2.8. Karakterizacija β-laktamaza

*Detekcija gena koji kodiraju β-laktamaze proširenog spektra, AmpC β-laktamaze, karbapenemaze, fluorokinolonsku rezistenciju i kolistinsku rezistenciju*

Prisustvo gena koji kodiraju β-laktamaze širokoga i proširenog spektra (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>PER-1</sub>) [43][44][45][46], plazmidne AmpC β-laktamaze [47], skupinu A karbapenemaza (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, *bla*<sub>NMC</sub>) [48], metallo β-laktamaze (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> i *bla*<sub>NDM</sub>) [49] i karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze (*bla*<sub>OXA-48</sub>), [50] određivani su metodom PCR kao što je prethodno opisano. Skupina CTX-M β-laktamaza (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 i CTX-M-9) određivala se multiplex PCR-om [51]. Početnice za konzerivirane sekvencije 5'-CS i 3'-CS rabile su se kako bi se amplificirala skupina 1 integrona. PCR s početnicama za 5'-CS i 3'-CS u kombinaciji s *forward* i *revers* početnicama za *bla*<sub>VIM</sub> obavljale su se za određivanje lokacije *bla*<sub>VIM</sub> gena unutar skupine 1 integrona [52]. Qnr geni odgovorni za fluorokinolonsku rezistenciju detektirani su PCR s početnicama za qnrA, qnrB i qnrS [53]. U kolistin rezistentnih sojeva provodila se analiza kromosomskih mgr i plazmidnih mcr gena [54]. Metodom PCR mapping utvrdilo se postoji li prekid mgrB gena zbog insercijske sekvencije [55]. U sojeva pozitivnih na CTX-M β-laktamaze metodom PCR mapiranja utvrdio se položaj insercijskih sekvencija IS26 i ISEcp ispred ili iza gena. PCR je rađen s *forward* i *reverse* početnicom za insercijsku sekvenciju u kombinaciji s *forward* ili *reverse* početnicom za *bla*<sub>CTX-M</sub> gen [45]. Sojevi pozitivnih na OXA-48 β-laktamazu analizirani su na prisustvo IS1999 insercijske sekvencije ispred ili iza *bla*<sub>OXA-48</sub> gena metodom PCR mapiranja [56].

### 3.3.3. Analiza plazmida

Plazmidi su ekstrahirani s pomoću Qiagen Mini kita (Inel Medicinska tehnika). Plazmidna DNA služila je kao templat za multiplex PCR. Plazmidni ekstrakti su testirani s pomoću multiplex PCR-a kako bi se utvrdilo jesu li *bla* geni locirani na plazmidu. Veličina plazmida je određivana iz standardne krivulje logaritma molekularne težine četiriju plazmida veličine 7, 36, 64 i 150 kb iz *E. coli* 39R 861 u odnosu premlogaritmu njihove relativne pokretljivosti. Pripadnost inkopatibilnoj skupini određivana je metodom PCR-replicon typing [57].

### 3.4. Obrada podataka

Demografski podaci su prikazani pomoću deskriptivne statistike prema normalnosti raspodjele (D'Agostino-Pearsonov test za normalnost raspodjele).

Postojanje gram-negativnih bakterija u brisevima usne šupljine prije i poslije primjene profilaktičkog antibiotika je uspoređeno McNemarovim testom za parne uzorke.

Ovisno o normalnosti raspodjele, kontinuirane varijable su uspoređene Mann-Whitneyjevim testom za nezavisne uzorke ili t-testom za nezavisne uzorke. Kategoričke varijable su uspoređene hi-kvadrat testom.

Sve statističke analize su napravljene pomoću statističkog programa MedCalc 9.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). P vrijednosti manje od 0.05 su se smatrale statistički značajnima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osnovni podatci o bolesnicima s VAP

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 225 bolesnika s medijanom životne dobi 65 godina. Bilo je više ispitanika muškog spola. Jedna trećina bolesnika bila je s komorbiditetima (*Diabetes mellitus*, kronična bubrežna insuficijencija). Kod 27,11% bolesnika dijagnosticiran je VAP, najčešće kod bolesnika s komorbiditetima s time da je gotovo podjednaki broj bolesnika s ranim i kasnim razvojem VAP (Tablica 11.).

Tablica 11. Osnovni podatci o bolesnicima

<b>BROJ BOLESNIKA</b>	<b>225</b>
<b>DOB</b>	medijan: 65 raspon: 15-93
<b>SPOL</b>	muški: 156 (69,33%) ženski: 69 (30,67%)
<b>RASPODJELA BOLESNIKA PO ODJELIMA</b>	AIK: 84 bolesnika AIN 72 bolesnika AKA 69 bolesnika
<i>Diabetes mellitus</i>	74 (32,88%)
<b>Kronična bubrežna insuficijencija</b>	74 (32,88%)
<b>UMRLI</b>	39 (17,33%)
<b>BROJ BOLESNIKA S VAP</b>	61 (27,11%)
<b>RANI VAP</b>	35 (57,38%)
<b>KASNI VAP</b>	26 (42,62%)
<b>DOB BOLESNIKA S VAP</b>	medijan: 70,5 raspon: 19-91
<b>SPOL BOLESNIKA S VAP</b>	muški: 49 (80,33%) ženski: 12 (19,67%)
<i>Diabetes mellitus</i>	47 (77,04%)
<b>Kronična bubrežna insuficijencija</b>	43 (70,49%)
<b>BROJ DANA U JIL</b>	medijan: 8 raspon: 1 – 86, (IQR 14) (mean±SD: 15±18)
<b>BROJ VENTILATOR SATI</b>	medijan: 44 raspon: 0 – 1992 (IQR 241) (mean±SD: 223±367)
<b>UKUPAN BROJ DANA LIJEČENJA</b>	medijan: 20 raspon: 2 – 148 (25), (mean±SD: 28±23)
<b>UMRLI</b>	27 (44,26%)



#### 4.2. Broj sati ventilacije/broja dana liječenja u JIL-u/broj dana liječenja u bolnici bolesnika u kojih su izolirane gram-negativne bakterije

Broj sati ventilacije/broja dana liječenja u JIL/broj dana liječenja u bolnici bolesnika u kojih su izolirane gram-negativne bakterije u usnoj šupljini statistički je značajno veći nego u bolesnika kod kojih nisu izolirane gram-negativne bakterije (Mann-Whitneyev test). Prisustvo gram-negativnih bakterija u 2. brisu usne šupljine (poslije antibiotske profilakse) i aspiratu traheje produljuje broj sati na mehaničkoj ventilaciji, broj dana liječenja u JIL te broj dana hospitalizacije (Tablica 12.).

Tablica 12. Broj sati ventilacije/dana u JIL/dana liječenja u bolnici povezan je s prisutnošću gram-negativnih bakterija

GRAM- NEGATIVNE BAKTERIJE	MEDIAN, RANGE (IQR*)		
	SATI VENTILACIJE	DANI U JIL <sup>†</sup>	DANI HOSPITALIZACIJE
<b>Bris usne šupljine prije antibiotske profilakse</b>			
<b>Da</b>	250, 0-1236 (607)	13, 2-68 (27)	35, 2-73 (33)
<b>Ne</b>	39, 1-1992 (225)	8, 1-86 (13)	20, 2-148 (24)
<b>P</b>	0.050	0.059	0.253
<b>Bris usne šupljine poslije antibiotske profilakse</b>			
<b>Da</b>	187, 0-1992 (611)	13, 2-86 (26)	33, 2-108 (33)
<b>Ne</b>	24, 1-1572 (137)	6, 1-66 (11)	18, 2-148 (18)
<b>P</b>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>Aspirat traheje</b>			
<b>Da</b>	312, 0-1992 (651)	23, 2-86 (29)	37, 4-108 (31)
<b>Ne</b>	17, 0-1368 (91)	6, 1-59 (7)	16, 2-148 (13)
<b>P</b>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<b>MDR/XDR</b>			
<b>Da</b>	288, 12-1992 (706)	15, 2-60 (23)	36, 4-108 (44)
<b>Ne</b>	118, 0-1440 (606)	11, 5-86 (37)	25, 2-64 (30)
<b>P</b>	0.047	0.032	0.094

\* IQR – interkvartilni raspon

#### 4.3. Povezanost VAP s prisutnošću gram-negativnih bakterija u brisevima usne šupljine te aspiratu traheje

VAP nije povezan s prisutnošću gram-negativnih bakterija u 1. brisu usne šupljine (prije primjene profilaktičkog antibiotika),  $P=0,320$ . VAP je dobilo 36,84% ( $n=7$ ) bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije u 1. brisu usne šupljine te 26,21% ( $n=54$ ) bolesnika koji nisu imali gram-negativne bakterije u prvom brisu (hi-kvadrat test). Hi kvadrat testom nije utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 13.).

Tablica 13. Gram-negativne bakterije u 1. brisu usne šupljine

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE U 1. BRISU USNE ŠUPLJINE	UPALA PLUĆA (broj bolesnika)		UKUPNO
	DA	NE	
DA	7 (36,84%)	12 (63,16%)	19
NE	54 (26,21%)	152 (73,79%)	206
UKUPNO	61 (27,11%)	164 (72,89%)	225

VAP je povezan s prisutnošću gram-negativnih bakterija u 2. brisu usne šupljine (nakon profilaktičkog antibiotika),  $P<0,001$ . VAP je dobilo 43% ( $n=29$ ) bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije u 2. brisu usne šupljine te 20% ( $n=32$ ) bolesnika koji nisu imali gram-negativne bakterije u drugom brisu (hi-kvadrat test). Hi kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika (Tablica 14.).

Tablica 14. Gram-negativne bakterije u 2. brisu usne šupljine

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE U2. BRISU USNE ŠUPLJINE	UPALA PLUĆA (broj bolesnika)		UKUPNO
	DA	NE	
DA	29 (42,65%)	39 (57,35%)	68
NE	32 (20,38%)	125 (79,62%)	157
UKUPNO	61 (27,11%)	164 (72,89%)	225

Pojava VAP povezana je s prisutnošću gram-negativnih bakterija u aspiratu traheje (nakon profilaktičkog antibiotika),  $P < 0,001$ . VAP je dobilo 49% ( $n=36$ ) bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije u aspiratu traheje te 16% ( $n=23$ ) bolesnika koji nisu imali gram-negativne bakterije u aspiratu traheje (hi-kvadrat test). Hi kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika (Tablica 15.).

Tablica 15. Gram-negativne bakterije u aspiratu traheje

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE U ASPIRATU TRAHEJE	UPALA PLUĆA (broj bolesnika)		UKUPNO
	DA	NE	
	DA	36 (48,65%)	
NE	23 (15,86%)	122 (84,14%)	145
UKUPNO	59 (26,94%)	160 (73,06%)	219*

\*AT nije dobiven kod svih bolesnika

Kod 66% ( $n=42$ ) bolesnika iz 2. brisa usne šupljine i aspirata traheje izolirana je ista vrsta bakterije s istim antibiogramom (Tablica 16).

Tablica 16. U 2.brisu usne šupljine i aspiratu traheje izolirani su isti mikroorganizmi

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE			UKUPNO
2. BRIS USNE ŠUPLJINE	AT		
	DA	NE	
DA	42 (65,62%)	22(34,38%)	64
NE	32 (20,65%)	123 (79,35%)	155
UKUPNO	74 (33,79%)	145 (66,21%)	219*

\* AT nije dobiven kod svih bolesnika

Bris usne šupljine je prediktor kolonizacije donjeg dišnog sustava gram-negativnim bakterijama i prediktor rizika za razvoj VAP kod ventiliranih bolesnika. U Tablici 17. je prikazan utjecaj postojanja gram-negativnih bakterija na pojavu ventilatorom prouzročene upale pluća, razlike u brisevima te aspiratu traheje.

Tablica 17. Utjecaj postojanja gram-negativnih bakterija na pojavu VAP

	<b>PREPROFILATIČKI BRIS</b>	<b>POSTPROFILATIČKI BRIS</b>	<b>ASPIRAT TRAHEJE</b>
ROC	0.521	0.619	0.686
CI*	0.453 do 0.588	0.552 do 0.683	0.620 do 0.747
z	0.905	3.273	5.148
P	0.365	0.001	<0.001
Osjetljivost	11.48	47.54	61.02
Specifičnost	92.68	76.22	76.25
PPV <sup>†</sup>	36.71	42.51	85.75
CI*	13.188 do 68.895	33.691 do 51.832	72.118 do 93.335
NPPV <sup>§</sup>	73.8955	79.71	86.97
CI*	70.56 do 76.976	75.50 do 83.35	83.364 do 89.893

\* PPV – positive predictive value (pozitivna prediktivna vrijednost)

† CI – confidence interval (interval pouzdanosti)

§ NPV – negative predictive value (negativna prediktivna vrijednost)

Nakon primjene profilaktičkog antibiotika povećava se kolonizacija bolesnika s gram-negativnim bakterijama (Tablica 18).

Tablica 18. Mikroorganizmi prisutni u brisu usne šupljine prije i poslije primjene profilaktičkog antibiotika te u aspiratu traheje

MIKROORGANIZMI	KOLONIZACIJA (BROJ)		
	1 BRIS PRIJE ATB PROFILAKSE*	2 BRIS POSLIJE ATB PROFILAKSE*	ASPIRAT TRAHEJE *†
Candida	6	0	9
<b>Gram +</b>			
<b><u>Staphylococcus</u></b>			
Spp.	1	0	7
Aureus	14	0	1
MRSA	3	0	4
Epidermidis	0	0	2
<b><u>Streptococcus</u></b>			
Species (viridans)	2	0	6
Pneumoniae	0	0	4
Oralis	0	0	1
<b><u>Enterococcus faecalis</u></b>	0	0	6
<b><u>Corynebacterium</u></b>	0	0	1
<b><u>Rothia mucilaginosa</u></b>	0	0	1
<b>UKUPNO</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>33</b>
<b>Gram –</b>			
<b><u>Escherichia coli</u></b>	4	3	4
ESBL	0	1	0
<b><u>Klebsiella</u></b>			
<b><u>Pneumoniae</u></b>	2	3	9
<b><u>ESBL</u></b>	1	2	0
Oxa-48	0	1	0
Oxytoca	3	1	0
Aerogenes	1	1	1
<b><u>Pseudomonas aeruginosa</u></b>	5	33	43
<b><u>Citrobacter</u></b>			
Freundii	0	2	0
Koseri	1	0	1
<b><u>Acinetobacter</u></b>			
<b><u>baumanni</u></b>	2	14	11
Pittii	0	0	1
<b><u>Enterobacter</u></b>			
Cloacae	0	4	2
Aerogenes	0	1	0
<b><u>Stenotrophomonas maltophilia</u></b>	0	2	6
<b><u>Proteus mirabilis</u></b> (Isti bolesnici i prije i nakon ATB profilakse)	2	2	1
<b><u>Burkholderia gladioli</u></b>	0	1	1
<b><u>Serratia marcescens</u></b>	0	1	1
<b><u>Neisseria saprophytica</u></b>	1	0	1
<b><u>Achromobacter xylosoxidans</u></b>	0	0	1
<b><u>Haemophilus influenzae</u></b>	0	0	5
<b><u>Moraxella catarrhalis</u></b>	0	0	1
<b>UKUPNO</b>	<b>22</b>	<b>72</b>	<b>89</b>
Normalna flora	128	0	0
Sterilno	55	149	114

\* Nekoliko je bolesnika imalo višestruku kolonizaciju

† U šest bolesnika nije uzet AT

Raspodjela bakterija u 2. brisu usne šupljine (nakon primjene ATB)

1. *Pseudomonas aeruginosa* – 33 (14,67%)
2. *Enterobacteriaceae* 22 (9,78%)
3. *Acinetobacter baumannii* 14 (6,23%)
4. *Stenotrophomonas maltophilia* 2 (0,89%)

Raspodjela bakterija u aspiratu traheje (nakon primjene ATB)

1. *Pseudomonas aeruginosa*– 43 (19,63%)
2. *Enterobacteriaceae* 19 (8,67%)
3. *Staphylococcus* 14 (6,39%)
4. *Acinetobacter baumannii* 12 (5,47%)
5. *Streptococcus* 11 (5,02%)
6. *Stenotrophomonas maltophilia* 6 (2,74%)

Utvrđen je značajan porast stope gram-negativnih bakterija u usnoj šupljini nakon primjene antibiotika (8% vs 30%). U prvom je brisu 19 bolesnika imalo GNB, a 206 nije (19/225=8%). U 2. brisu gram-negativne bakterije imalo je 68 bolesnika (30%), a 157 nije (Tablica 19).

Postoji značajna razlika u prisustvu gram-negativnih bakterija u brisevima usne šupljine prije i poslije primjene profilaktičkog antibiotika,  $P < 0,001$  (McNemar test (test za uparene uzorke s kategorijalnim podacima) (Tablica 19.)

Tablica 19. Broj bolesnika s gram-negativnim bakterijama u brisevima usne šupljine prije i nakon primjene profilaktičkih antibiotika

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE U BRISU USNE ŠUPLJINE	BROJ BOLESNIKA	
	PRIJE PROFILAKSE ANTIBIOTICIMA	NAKON PROFILAKSE ANTIBIOTICIMA
DA	19 (8,44%)	68 (30,22%)
NE	206 (91,55%)	157 (69,78%)

U aspiratima traheje su dokazane višestruke kolonizacije mikroorganizama (Tablica 20).

Tablica 20. Višestruka kolonizacija u aspiratu traheje

<b>KOMBINACIJE MIKROORGANIZAMA</b>		<b>BROJ BOLESNIKA</b>
<b>1. BRIS USNE ŠUPLJINE</b>	<b>2. BRIS USNE ŠUPLJINE</b>	
<b>1. BRIS USNE ŠUPLJINE</b>	<i>Streptococcus species</i>	1
	<i>Candida</i>	1
	<i>Neisseria saprophytica</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	1
<b>2. BRIS USNE ŠUPLJINE</b>	<i>Klebsiella pneumoniae ESBL</i>	1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<b>AT</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Streptococcus epidermidis</i>	1
	<i>Citrobacter koseri</i>	1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
	<i>Acinetobacter pittii</i>	1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Enterococcus faecalis VRE</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	1
	<i>Escherichia coli + Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Serratia marcescens</i>	1
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
	<i>MRSA</i>	1
	<i>Proteus mirabilis</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
	<i>Acinetobacter</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae ESBL</i>	1
	<i>Streptococcus species (viridans)</i>	1
	<i>Candida</i>	1
	<i>Candida</i>	1
	<i>Burkholderia gladioli</i>	1
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
	<i>Escherichia coli + Haemophilus influenzae</i>	1
	<i>Streptococcus oralis</i>	1
	<i>Naesseria saprophytica + Enterococcus faecalis</i>	1

A Utjecaj antibiotika širokog spektra na selekcioniranje gram negativnih bakterija u usnoj šupljini“

#### 4.4. Utjecaj antibiotika širokog spektra na selekcioniranje gram negativnih bakterija u usnoj šupljini

Utvrđeno je da antibiotici širokog spektra (cefuroksim, cefazolin) nisu selekcionirali gram-negativne bakterije u usnoj šupljini u odnosu prema antibioticima uskog spektra (ceftriakson, vankomicin, linezolid). Ne postoji statistički značajna razlika između utjecaja antibiotika širokog spektra i antibiotika uskog spektra (Tablica 21).

$\chi^2 = 1.116372099 < 3,841$  (granična vrijednost  $\chi^2$ -kvadrat uz 1 stupanj slobode na razini značajnosti od 5%).

Tablica 21. Utjecaj antibiotika na selekciju gram-negativnih bakterija u usnoj šupljini

GRAM- NEGATIVNE BAKTERIJE U BRISU USNE ŠUPLJINE	BROJ BOLESNIKA		UKUPNO
	ATB širokog spektra	ATB uskog spektra	
	DA	58 (28,86%)	10 (41,67%)
NE	143 (71,14%)	14 (58,33%)	157
UKUPNO	201(89,33%)	24 (10,67%)	225

#### 4.5. Utjecaj fenotipa rezistencije na potrebu za promjenom antibiotika

Promjena antibiotske terapije bila je indicirana u većem postotku bolesnika (88,57% bolesnika) s MDR-GNB, u odnosu prema onima koji su imali osjetljive bakterije (60% bez MDR-GNB).  $P=0,008$  ( $\chi^2$ -kvadrat test).  $\chi^2$  kvadrat testom je utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 22).

Postoji više fenotipova rezistencije ovisno o determinantama rezistencije koje posjeduje određeni izolat. Ako soj proizvodi  $\beta$ -laktamazu proširenog spektra biti će rezistentan na cefalosporine prve, druge, treće i četvrte generacije, monobaktame i peniciline, ali osjetljiv na karbapeneme i cefamicine. Ako proizvodi AmpC  $\beta$ -laktamazu biti će rezistentan na



peniciline, prvu, drugu i treću generaciju cefalosporina, monobaktame i cefamicine, ali osjetljiv na četvrtu generaciju cefalosporina i karbapeneme. Fenotip rezistencije kod karbapenemaza ovisi o tipu karbapenemaze. Sojevi pozitivni na KPC iskazuju rezistenciju na sve  $\beta$ -laktamske antibiotike dok oni pozitivni na metalo- $\beta$ -laktamaze ostaju osjetljivi na aztreonam a stupanj rezistencije na karbapeneme ovisi o ekspresiji rezistencije. OXA-48 iskazuje varijabilnu hidrolizu karbapenema tako da je često samo ertapenem rezistentan, a imipenem i meropenem mogu biti osjetljivi. OXA-48 ne hidrolizira cefalosporine pa se rezistencija na njih javlja ako postoji i dodatna ESBL ili AmpC  $\beta$ -laktamaza. Kako je broj sojeva s određenim determinantama rezistencije, malen statistika je odrađivana na ukupnom broju multirezistentnih bakterija bez obzira na specifičan mehanizam rezistencije.

Tablica 22. Fenotip rezistencije utječe na potrebu za promjenom antibiotika (eskalacija i deeskalacija)

<b>REZISTENTNE GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE</b>	<b>PROMJENA ANTIBIOTIKA</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	31 (88,57%)	4 (11,43%)
<b>NE</b>	18 (60%)	12 (40%)

Empirijska terapija bila je prikladna u samo 8,57% bolesnika s MDR-GNB u odnosu prema 40% bolesnika koji nisu imali MDR-GNB ( $P=0,003$ , hi-kvadrat test). Hi kvadrat testom je utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 23).

Tablica 23. Utjecaj fenotipa rezistencije na uspjeh odabira empirijske terapije

<b>REZISTENTNE GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJA</b>	<b>ADEKVATNA EMPIRIJSKA TERAPIJA</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	3 (8,57%)	32 (91,43%)
<b>NE</b>	12 (40%)	18 (60%)

Selekcija GNB utjecala je na potrebu za promjenom antibiotika u 79,25% bolesnika (Tablica 24).

Tablica 24. Selekcija antibiotika/potrebna promjena

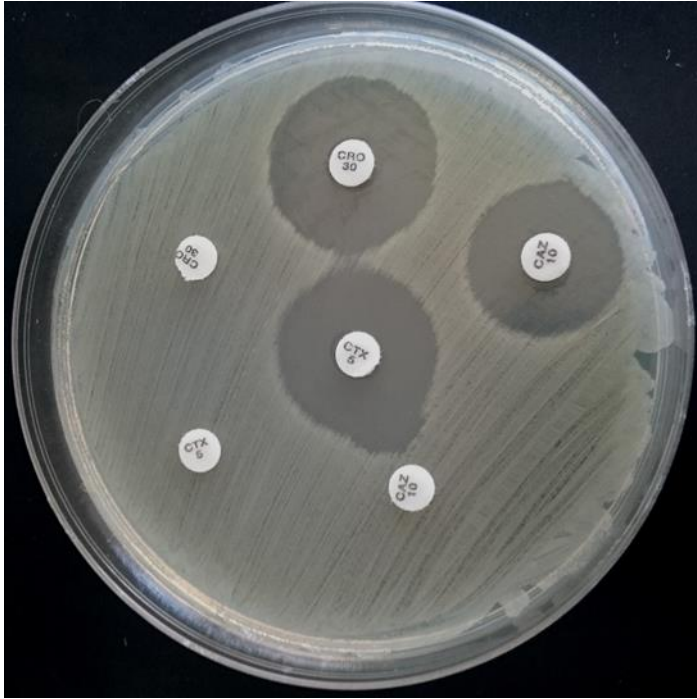
SELEKCIJA GRAM-NEGATIVNIH BAKTERIJA	PROMJENA TERAPIJE	
	DA	NE
DA	42 (79,25%)	11 (20,75%)
NE	9 (60%)	6 (40%)

#### 4.6. Molekularna detekcija gena

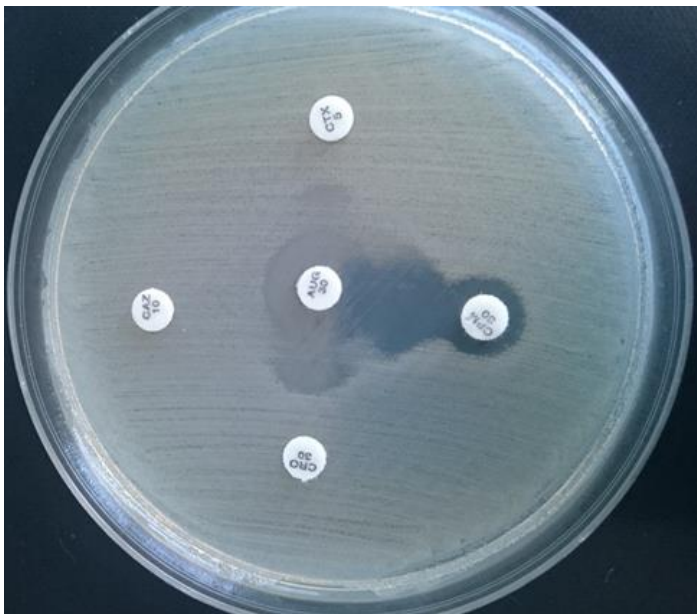
Molekularna karakterizacija mehanizama rezistencije metodom PCR, metoda lančane reakcije polimeraze u rezistentnih izolata (ESBL, ampC, karbapenemaze)

##### 4.6.1. *Klebsiella pneumoniae*

Izolati su bili jedinstveno otporni na amoksicilin zbog unutrašnje rezistencije. Umjerene stope rezistencije od 50% (5/10) opažene su za piperacilin/tazobaktam, cefazolin i amoksicilin/klavulansku kiselinu, dok je visoka stopa rezistencije otkrivena za ciprofloksacin (70% – 7/10). Postojala je jednaka osjetljivost na imipenem, meropenem i kolistin, ali je smanjena osjetljivost na ertapenem primijećena u jednom soju. Dva izolata fenotipski su bila pozitivna na ESBL, a dva na karbapenemaze. Četiri izolata klasificirana su kao MDR i pokazala su otpornost na ESC (Tablica 25.). Rezistencija na cefotaksim prenesena je na sojeve primatelja *E. coli* s frekvencijom u rasponu od 10<sup>-8</sup> do 10<sup>-6</sup>. Otpornost na tetraciklin i gentamicin prenesena je iz oba soja, a na sulfametoksazol/trimetoprim iz jednog soja. Dva izolata i njihovi transkonjuganti bili su pozitivni na gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Genima *bla<sub>CTX-M-15</sub>* prethodio je ISEcp insercijski niz. Dva izolata pozitivna su na gene *bla<sub>OXA-48S</sub>* IS1999 uzvodno od gena. Svi izolati sadrže intrinzični gen *bla<sub>SHV-1</sub>*. FIIIs plazmid pronađen je u dva ESBL pozitivna organizma, dok je L plazmid povezan s OXA-48 karbapenemazom.



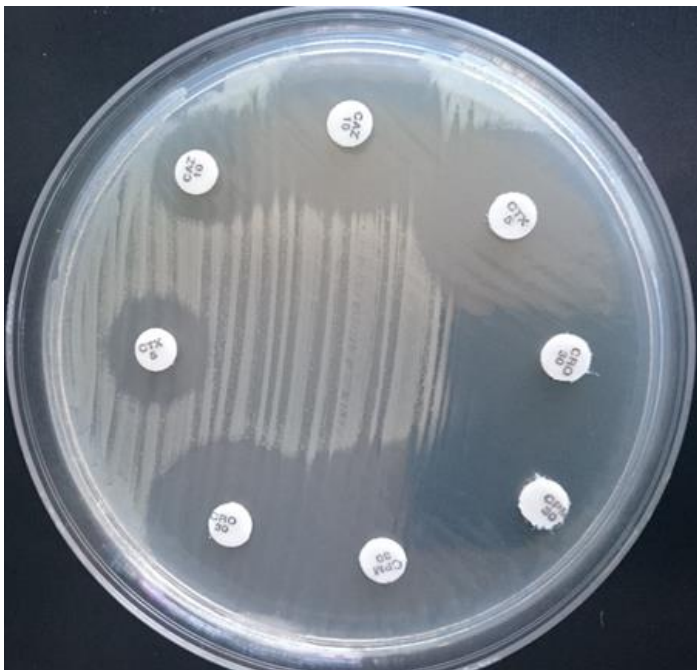
Slika 24. Metode kombiniranih diskova za detekciju ESBL. Vidi se uvećanje inhibicijske zone oko diskova cefalosporina uz dodatak klavulanske kiseline u odnosu na kontrolne diskove bez klavulanske kiseline. Izvor: KBC Zagreb



Slika 25. Metoda dvostrukog diska za detekciju ESBL. Vidi se deformacija inhibicijskih zona oko diskova cefalosporina u smjeru centralnog diska koji sadržava klavulansku kiselinu. Izvor: KBC Zagreb

#### 4.6.2. *Enterobacter cloacae*

*E. cloacae* pokazao je fenotipove promjenjive rezistencije. Dva izolata bila su rezistentna samo na amoksicilin i u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, cefazolinom, cefuroksimom, cefotaksimom, ceftriaksonom i cefepimom. Jedan izolat pokazao je otpornost na karbapeneme (Tablica 25.). Jedan izolat pokazao je pozitivan kombinirani disk test s klavulanskom kiselinom koji upućuje na proizvodnju ESBL, dok je drugi pokazao pozitivan Hodgeov test i test na bazi inhibitora s EDTA sumnjivom na MBL. Dva su izolata bili MDR i sadržavali su određene stečene rezistencije. *E. cloacae* pokazao je gene s varijabilnom stečenom rezistencijom. Rezistencija na meropenem kao prenosiva na soj primatelja *E. coli*, ali markeri rezistencije na ne- $\beta$ -laktamske antibiotike nisu kotransferirani. PCR i sekvenciranje identificirali su VIM-1 i CTX-M-15 u jednom izolatu, kao što je prikazano u Tablici 25. Gen blaVIM nošen je A/C plazmidom.



Slika 26. Hiperprodukcija AmpC  $\beta$ -laktamaze u bakterije *Enterobacter* se dokazuje na temelju uvećanja inhibicijske zone oko diskova cefalosporina uz dodatak fenilboronične kiseline (PBA) u odnosu na kontrolne diskove bez PBA. Izvor: KBC Zagreb

#### **4.6.3. *Escherichia coli***

Tri izolata *E. coli* bila su osjetljiva na sve ispitane antibiotike osim na amoksisilin, dok je jedan soj pokazao rezistenciju na cefalosporine i cefepim proširenog spektra i pozitivan test na bazi inhibitora s klavulanskom kiselinom (Tablica 25.). Pokazalo se da jedan fenotipski pozitivan izolat MDR za ESBL posjeduje gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, dok je gen *bla*<sub>TEM-1</sub> identificiran PCR metodom u tri soja otporna na amoksisilin (Tablica 25.).

#### **4.6.4. *Proteus mirabilis***

Utvrđeno je da je jedan izolat otporan na ampicilin zbog TEM-1 širokog spektra  $\beta$ -laktamaze.

#### **4.6.5. *Klebsiella aerogenes, Citrobacter freundii, Serratia marcescens***

Među navedenim vrstama otkrivena je samo unutarnja otpornost (Tablica 25.).

#### **4.6.6. *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* pokazao je visoku stopu rezistencije na meropenem i imipenem (63% – 19/30) i umjerenu na gentamicin (53% – 16/30), ciprofloksacin (47% – 14/30), ceftazidim (40% – 12/30) ) cefepim i piperacilin/tazobaktam (30% – 9/30). Amikacin je očuvao dobru aktivnost sa samo 10% (3) rezistentnih sojeva kako je prikazano u Tablici 26. Nije bilo rezistencije na kolistin i ceftolozan/tazobaktam. Među 30 izolata sedam je klasificirano kao MDR, a pet kao XDR.

Četiri izolata dala su PCR produkt s VIM specifičnim primerima, a jedan s PER-1 specifičnim primerima kako je prikazano u Tablici 26. Geni *bla*<sub>VIM</sub> dodijeljeni su u klasu 1 integron. Proizvodnja MBL bila je povezana s visokom razinom rezistencije na karbapeneme, a PER-1 s otpornošću na ceftazidim i cefepim.

#### **4.6.7. *Acinetobacter baumannii***

Svi su osim jednog soja (93%) bili rezistentni na imipenem, meropenem, piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, cefepim, gentamicin i ciprofloksacin (Tablica 27). Stopa rezistencije na ampicilin/sulbaktam bila je 36% (5/14). Nije primijećena rezistencija na kolistin. Samo je jedan soj bio S, dok su svi drugi bili klasificirani kao XDR. Osim unutarnjeg gena *bla*<sub>OXA-51</sub>, tri izolata sadrže *bla*<sub>OXA-23</sub> sličan i deset *bla*<sub>OXA-24</sub> sličnih (Tablica 27). Utvrđeno je da jedan soj *A. baumannii* negativan na CHDL, pripada SG 2 koji odgovara IC I, dok su ostali sojevi pozitivni na CHDL dodijeljeni SG 1 koji odgovaraju IC II. PBRT je bio negativan za bilo koju od skupina inkompatibilnosti plazmida do sada prijavljenih u *A. baumannii* osim za tri soja s OXA23 koji su pripadali Inc skupini<sub>6</sub> koja kodira gen *aci6*-replikaze izvorno pronađen na plazmidu pACICU2.

#### **4.6.8. *Stenotrophomonas maltophilia***

Osjetljivost na sulfomtoksazol/trimetoprim i levofloksacin potvrđena je testom difuzije diska u svim izolatima.

#### **4.6.9. *Burkholderia gladioli***

*B. gladioli* bila je otporna na sve ispitane antibiotike.

Sedamdeset izolata iz AT imalo je prema rutinskom testu difuzije diska isti obrazac osjetljivosti na antibiotike kao i odgovarajući izolati iz brisa usne šupljine, ali molekularna analiza determinanti rezistencije nije provedena.

U Tablici 25. prikazana je osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi, sadržaj gena rezistencije i klinički podaci izolata *Enterobacteriaceae*.

Tablica 25. Osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi, sadržaj gena rezistencije i klinički podaci izolata *Enterobacteriaceae*.

R.R.	BROJ IZOLATA	IZOLAT	ODJEL	REZISTENCIJA	ESBL	AMP-C	Hodge	CIM	AMX	AMC	TZP	CAZ	CTX	CRO	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	COL	BL
<b>a) <i>Klebsiella spp</i></b>																						
1	1	<i>K. pneumoniae</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	4	0.5	2	0.06	0.06	0.12	0.06	0.06	0.12	0.25	>128	0.06	SHV-11
2	17	<i>K. pneumoniae</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	2	8	0.12	0.12	0.12	0.06	0.06	0.12	0.5	0.25	>128	0.06	SHV-11
3	47	<i>K. pneumoniae</i>	AKA	MDR	-	-	+	+	>128	>128	>128	0.5	0.5	1	0.25	1	1	4	0.5	>128	0.06	SHV-11, OXA-48
4	37	<i>K. oxytoca</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	64	64	0.12	0.25	0.12	0.06	0.12	0.25	0.25	0.12	>128	0.25	SHV-11 OXA-48
5	64	<i>K. pneumoniae</i>	AKA	S	-	-	+	+	>128	>128	>128	0.5	0.5	1	0.25	1	2	4	0.25	0.25	0.06	SHV-11 OXA-48
6	115	<i>K. pneumoniae</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	8	2	0.25	0.12	0.12	0.06	0.12	0.25	0.5	0.25	0.06	0.06	SHV-11
7	107	<i>K. pneumoniae</i>	AIN	S	-	-	-	-	>128	4	8	0.12	0.06	0.12	0.06	0.06	0.25	1	0.5	0.06	0.12	SHV-11
8	127	<i>K. pneumoniae</i> ESBL	AIK	MDR	+	-	-	-	>128	>128	>128	64	>128	>128	32	0.12	0.06	16	32	>128	1	CTX-M-15
9	51	<i>K. pneumoniae</i>	AKA	S	-	-	-	-	>128	2	16	0.5	1	1	0.12	0.06	0.12	0.5	32	>128	0.25	SHV-1
10	154	<i>K. pneumoniae</i> ESBL	AIK	MDR	+	-	-	-	>128	>128	>128	64	>128	>128	64	0.12	1	1	>128	>128	0.25	CTX-M-15
<b>b) <i>E. cloacae</i></b>																						
1	60	<i>E. cloacae</i>	AIN	MDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	8	16	2	1	2	AmpC, VIM CTX-M-15-1
2	120	<i>E. cloacae</i> ESBL	AKA	MDR	+	+	-	-	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	1	0.5	1	0.25	>128	0.5	AmpC
3	15	<i>E. cloacae</i>	AIK	S	-	+	-	-	>128	>128	32	4	2	4	1	0.5	0.12	1	8	0.25	0.06	AmpC
4	167	<i>E. cloacae</i>	AIN	S	-	+	-	-	>128	>128	64	1	2	2	0.5	1	0.5	0.5	0.5	8	0.12	AmpC
<b><i>K. aerogenes</i></b>																						
3	147	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AIN	S	-	-	-	-	>128	>128	16	1	0.5	1	0.25	0.12	0.06	0.5	0.25	0.06	0.12	ampC
4	35	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	>128	8	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.06	0.5	0.25	0.06	0.06	ampC
<b>c) <i>Escherichia coli</i></b>																						
1	1	<i>E. coli</i>	AIK	S	-	-	-	-	>128	2	2	0.12	0.25	0.25	0.06	0.25	0.06	1	0.25	1	0.06	TEM-1
2	26	<i>E. coli</i>	AIN	MDR	+	-	-	-	>128	8	16	32	>128	>128	16	0.5	0.12	1	1	2	0.25	CTX-M-15

**Kratice:** AMX – amoksicilin; AMC – amoksicilin/klavulanska kiselina; TZP – piperacilin/tazobaktam; CAZ – ceftazidim; CTX – cefotaksim; CRO – ceftriakson; FEP – cefepim; IMI – imipenem; MEM – meropenem; ERT – ertapenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; COL – kolistin; ESBL – test na bazi inhibitora s klavulanskom kiselinom za detekciju beta-laktamaza proširenog spektra; Amp-C – test na bazi inhibitora s fenilobornom kiselinom za otkrivanje AmpC beta-laktamaza; BL-beta-laktamaze; CIM – metoda inaktivacije karbapenema, AIK – kirurški JIL; AKA – kardiokirurški JIL; AIN – neurokirurški JIL; S – osjetljiv; MDR – otporan na više vrsta lijekova; XDR – opsežno rezistentan na lijekove.

U Tablici 26. prikazana je osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi, sadržaj gena rezistencije izolata *P. Aeruginosa*.

Tablica 26. Osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi i sadržaj gena rezistencije *P. aeruginosa*

R. B.	BROJ IZOLATA	ODJEL	REZISTENCIJA	ESBL	AMP-C	Hodge	CIM	EDTA	TZP	CAZ	FEP	IMI	MEM	GM	AMI	CIP	COL	BL
1.	1	AIK	S	-	-	-	-	-	1	0.5	1	16	32	16	4	32	0.5	
2	2	AIK	S	-	-	-	-	-	2	32	2	16	64	32	4	0.25	2	
3.	40	AIK	MDR	-	-	-	-	-	2	2	1	32	32	32	8	>128	2	
4	16	AIK	XDR	-	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	2	VIM-2
5	15	AIK	S	-	-	-	-	-	4	0.5	1	2	2	1	8	>128	2	
6	11	AIN	XDR	-	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	2	VIM-2
7	30	AKA	S	-	+	-	-	-	64	32	16	4	2	0.5	4	0.5	2	PER-1
8	31	AKA	S	-	+	-	-	-	>128	32	32	2	4	1	8	0.25	2	AmpC
9	76	AIN	S	-	-	-	-	-	4	1	1	1	4	1	8	0.25	0.5	
10	52	AKA	S	-	-	-	-	-	1	1	1	1	4	1	4	0.25	0.5	
11	44	AIK	MDR	-	-	-	-	-	1	2	0.5	16	32	>128	2	64	2	
12	50	AIN	S	-	-	-	-	-	4	1	1	1	4	2	44	0.5	2	
13	80	AIK	XDR	-	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	>128	2	VIM-2
14	14	AIK	XDR	-	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	>128	1	VIM-2
15	113	AIK	MDR	-	-	-	-	-	8	1	0.5	16	32	32	4	>128	2	
16	117	AIK	S	-	-	-	-	-	4	2	0.5	1	0.25	0.25	16	>128	2	
17	126	AIK	S	-	-	-	-	-	2	1	1	16	16	32	16	>128	1	
18	128	AIN	S	-	-	-	-	-	1	2	2	2	0.25	0.5	4	0.5	1	
19	129	AIN	S	-	-	-	-	-	4	1	0.5	16	32	1	8	0.25	2	
20	151	AIK	MDR	-	-	-	-	-	8	2	2	32	32	64	16	>128	1	
21	131	AIN	S	-	-	-	-	-	2	1	0.5	1	0.25	0.5	16	0.25	2	
22	163	AKA	MDR	-	-	-	-	-	64	32	64	32	32	>128	64	8	2	AmpC
23	160	AIN	MDR	-	-	-	-	-	32	32	16	16	32	0.5	16	8	2	AmpC
24	158	AIN	S	-	-	-	-	-	>128	64	64	16	32	0.5	0.25	2	1	AmpC
25	152	AIK	XDR	-	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	2	VIM-2
26	164	AKA	S	-	-	-	-	-	16	2	16	16	32	0.25	2	8	0.5	AmpC
27	183	AKA	S	-	-	-	-	-	8	2	2	2	0.25	0.12	0.5	8	2	
28	199	AKA	S	-	-	-	-	-	16	16	2	16	32	0.25	2	8	0.5	AmpC

**Kratice:** CAZ – ceftazidim; FEP – cefepim; IMI – imipenem; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; COL – kolistin; test na bazi inhibitora ESBL-a s klavulanskom kiselinom za otkrivanje beta-laktamaza proširenog spektra; test temeljen na inhibitoru Amp-C s fenilobornom kiselinom za detekciju AmpC beta-laktamaza; CIM – metoda inaktivacije karbapenema; BL-beta-laktamaze; AIK – kirurški JIL; AKA – kardiokirurški JIL; AIN – neurokirurški JIL; S – osjetljiv; XDR – opsežno otporan na više lijekova.



U Tablici 27. prikazana je osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi, sadržaj gena rezistencije izolata *A. Baumannii*.

Tablica 27. Osjetljivost na antibiotike, fenotipski testovi i sadržaj gena rezistencije *A. baumannii*

R. B.	BROJ IZOLATA	ODJEL	REISTE NCIJA	ESBL	Hodge	CIM	EDTA	TZP	CAZ	CTX	CRO	FEP	IPMI	MEM	GM	CIP	SAM	COL	BL
1	39	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	1	OXA-24-like
2	106	AIN	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	1	OXA-24-like
3	66	AIN	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	1	OXA-24-like
4	103	AIN	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	1	OXA-24-like
5	72	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	2	OXA-24-like
6	116	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	2	OXA-24-like
7	122	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	2	OXA-24-like
8	125	AIK	S	-	-	-	-	8	8	>128	>128	8	2	1	0.5	0.12	4	0.5	
9	153	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	1	OXA-23-like
10	154	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	1	OXA-23-like
11	177	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	0.5	OXA-23-like
12	203	AKA	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	2	OXA-24-like
13	219	AIN	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	1	OXA-24-like
14	156	AIK	XDR	-	+	+	+	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	1	OXA-24-like

**Kratice:** CAZ – ceftazidim; CTX – cefotaksim; CRO – ceftriakson; FEP – cefepim; IMI – imipenem; MEM – meropenem; SAM – ampicillin/sulbaktam; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; COL – kolistin; test na bazi inhibitora ESBL-a s klavulanskom kiselinom za detekciju beta-laktamaza proširenog spektra; test na bazi inhibitora Amp-C s fenilobornom kiselinom za otkrivanje AmpC beta-laktamaza; test na bazi EDTA-inhibitora EDTA za otkrivanje MBLs; BL-beta-laktamaze; CIM – metoda inaktivacije karbepenema; NT – nije testirano; AIK – kirurški JIL. AIN – neurokirurški JIL, AKA – kardiokirurški JIL; S – osjetljiv; MDR – rezistentan na više lijekova; XDR – opsežno rezistentan na lijekove.

Svi izolati imaju svojstven gen sličan *bla<sub>OXA-51</sub>*, izolat 125 sadrži samo gen sličan *bla<sub>OXA-51</sub>* a da nije stekao CHDL.

#### 4.7. Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s kroničnim bolestima (*Diabetes mellitus*, kronična bubrežna insuficijencija)

##### 4.7.1. Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s *Diabetes mellitus*

Gram-negativne bakterije su statistički značajno u većem postotku izolirane u bolesnika s *Diabetes mellitus* u odnosu na bolesnike bez *Diabetes mellitus* (Tablica 28., Tablica 29., Tablica 30. Tablica 31).

Tablica 28. GNB u 1. brisu (prije profilakse ATB) u bolesnika koji imaju *diabetes mellitus* (P=0,256, hi-kvadrat test)

DIABETES MELLITUS	GNB U 1. BRISU USNE ŠUPLJINE	
	DA	NE
DA	6 (12,5%)	42 (87,5%)
NE	13 (7,34%)	164 (92,66%)

Tablica 29. GNB u 2. brisu (nakon profilakse ATB) u bolesnika s *diabetes mellitus* (P=0,013, hi-kvadrat test)

DIABETES MELLITUS	GNB U 2. BRISU USNE ŠUPLJINE	
	DA	NE
DA	21 (43,75%)	27 (56,25%)
NE	47 (26,55%)	130 (73,45%)

Tablica 30. GNB u aspiratu traheje (nakon profilakse ATB) u bolesnika s *diabetes mellitus* (P=0,610, hi-kvadrat test)

<b>DIABETES MELLITUS</b>	<b>GNB U AT</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	17 (36,96%)	29 (63,04%)
<b>NE</b>	57 (32,95%)	116 (67,05%)

Tablica 31. Rezistentne GNB u aspiratu traheje (nakon profilakse ATB) u bolesnika s *diabetes mellitus* (P=0,001, hi-kvadrat test)

<b>DIABETES MELLITUS</b>	<b>REZISTENTNE GNB U AT</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	16 (84,21%)	3 (15,79%)
<b>NE</b>	20 (40,82%)	29 (59,18%)

#### 4.7.2. Prisutnost gram-negativnih bakterija u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom

Gram-negativne bakterije nisu statistički značajno u većem postotku izolirane u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom u odnosu na bolesnike bez kronične bubrežne insuficijencije kao ni rezistentne gram-negativne bakterije (Tablica 32, Tablica 33, Tablica 34, Tablica 35.).

Tablica 32. GNB u 1. brisu usne šupljine kod bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom. (P=0.852, hi-kvadrat test).

<b>KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA</b>	<b>GNB U 1. BRISU USNE ŠUPLJINE</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	2 (9,52%)	19 (90,48%)
<b>NE</b>	17 (8,33%)	187 (91,67%)

Tablica 33. GNB u 2. brisu usne šupljine (nakon profilakse ATB) u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom (P=0,863, hi-kvadrat test).

<b>KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA</b>	<b>GNB U 2. BRISU USNE ŠUPLJINE</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	6 (28,57%)	15 (71,43%)
<b>NE</b>	62 (30,39%)	142 (69,61%)

Tablica 34. GNB u aspiratu traheje (nakon profilakse ATB) u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom (P=0,424, hi-kvadrat test)

<b>KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA</b>	<b>GNB U AT</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	8 (42,11%)	11(57,89%)
<b>NE</b>	66(33%)	134(67%)

Kronična bubrežna insuficijencija nije čimbenik rizika za rezistentne GNB (P=0.121, hi-kvadrat test) (Tablica 34.). Hi kvadrat testom nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tablica 35. Rezistentne GNB u aspiratu traheje (nakon profilakse ATB) u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom

<b>KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA</b>	<b>REZISTENTNE GNB U AT</b>	
	<b>DA</b>	<b>NE</b>
<b>DA</b>	5 (83,33%)	1 (16,67%)
<b>NE</b>	31 (50%)	31 (50%)

#### 4.8. Smrtnost u bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije

Kod bolesnika u kojih su izolirane GNB utvrđena je statistički značajno veća smrtnost u odnosu na bolesnike kod kojih nisu bile izolirane GNB.

Smrtnost u bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije u 1. brisu usne šupljine (prije antibiotske profilakse) je 37 % (n=7) nasuprot 16% (n=32) bez gram-negativnih bakterija (P=0,019, hi-kvadrat test).

Smrtni je ishod evidentiran u 29% bolesnika (n=20) s gram-negativnim bakterijama u 2. brisu usne šupljine (poslije antibiotske profilakse) u odnosu prema 12% (n=19) bez gram-negativnih bakterija (P=0,002, hi-kvadrat test).

Još je veća razlika utvrđena kod aspirata traheje (30% bolesnika s GNB u odnosu prema 10% bez GNB). (P<0,001, hi kvadrat test).

MDR/XDR gram-negativne bakterije izolirane su u 36% bolesnika, a osjetljive u 32 bolesnika u 2. brisu usne šupljine (nakon antibiotske profilakse). Međutim fenotip rezistencije nije utjecao na stopu smrtnosti. Umrlo je 13 od 36 bolesnika (36%) s MDR/XDR gram-negativnom bakterijom nasuprot 6 od 36 bolesnika (17%) s osjetljivijim gram-negativnim bakterijama (P=0,114, hi-kvadrat test) (Tablica 36)

Tablica 36. Smrtnost u bolesnika s multirezistentnom (MDR) ili ekstenzivno rezistentnom (XDR) gram-negativnom bakterijom

GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE U 2. BRISU USNE ŠUPLJINE (POSLIJE ANTIBIOTSKE PROFILAKSE)	UMRLI	
	DA	NE
DA	13 (36,11%)	23 (63,85%)
NE	6 (18,75%)	26 (81,25%)

#### 4.9. Na različitim odjelima različito je zastupljena kolonizacija GNB

Razlike u kolonizaciji GNB postoje već u 1. brisu usne šupljine (preprofilaktički bris) te se nastavljaju u 2. brisu usne šupljine (postprofilaktičkom) i aspiratu traheje (Tablica 37, Tablica 38, Tablica 39). Hi kvadrat testom je utvrđena statistički značajna razlika.

Svi bolesnici su primali antibiotike u perioperativnoj profilaksi. Kardiokirurški (AKA) i neurokirurški (AIN) bolesnici primili su samo jednu dozu antibiotika, kardiokirurški cefuroksim, neurokirurški cefazolin ili ceftriakson, a kirurški bolesnici (AIK) dobili su cefazolin i metronidazol ili ciprofloksacin i metronidazol tijekom 24 sata. Bolesnici koji su u perioperativnoj profilaksi imali dva ili više antibiotika imali su češće gram-negativnu bakteriju u obrisku usne šupljine i aspiratu traheje (Tablica 38, Tablica 39). Brisevi bolesnika koji su primali antibiotike širokog spektra (cefuroksim, cefazolin) u odnosu na antibiotike uskog spektra (ceftriakson, vankomicin, linezolid) nisu bili statistički značajno više kolonizirani GNB što je vidljivo u tablicama 37 do 39.

Tablica 37. Razlike u kolonizaciji GNB u 1. brisu usne šupljine (preprofilaktičkom brisu) na odjelima AIK, AIN, AKA,  $P=0,1783$  (hi-kvadrat test)

ODJEL	GNB U 1. BRISU USNE ŠUPLJINE		UKUPNO
	DA	NE	
AIK	12 (14,29%)	72 (85,71%)	84
AIN	6 (8,33%)	66 (91,67%)	72
AKA	1 (1,45%)	68 (98,55%)	69
<b>UKUPNO</b>	19 (8,44%)	206 (91,56%)	225

Tablica 38. Razlike u kolonizaciji GNB u 2. brisu usne šupljine (postprofilaktičkom brisu)  
 P=0,006 (hi-kvadrat test)

ODJEL	GNB U 2. BRISU USNE ŠUPLJINE		UKUPNO
	DA	NE	
<b>AIK</b>	36 (42,86%)	48 (57,14%)	84
<b>AIN</b>	17 (23,61%)	55 (76,39%)	72
<b>AKA</b>	15 (21,74%)	54 (78,26%)	69
<b>UKUPNO</b>	68 (30,22%)	157 (69,78%)	225

Tablica 39. Razlike u kolonizaciji GNB u AT, P<0,001 (hi-kvadrat test)

ODJEL	GNB U AT		UKUPNO
	DA	NE	
<b>AIK</b>	28(35,44%)	51(64,56%)	79
<b>AIN</b>	34(47,89%)	37(52,11%)	71
<b>AKA</b>	12(17,39%)	57(82,61%)	69
<b>UKUPNO</b>	74(33,79%)	145 (66,21%)	219*

\* AT nije dobiven u svih bolesnika



Među odjelima nema razlike u kolonizaciji rezistentnim GNB  $P=0,155$  (hi-kvadrat test) (Tablica 40).

Tablica 40. Razlike u kolonizaciji rezistentnih gram-negativnih bakterija

ODJEL	REZISTENTNE GNB		UKUPNO
	DA	NE	
<b>AIK</b>	23 (63,89%)	13 (36,11%)	36
<b>AIN</b>	7 (38,89%)	11 (61,11%)	18
<b>AKA</b>	6 (42,86%)	8 (57,14%)	14
<b>UKUPNO</b>	36 (52,94%)	32 (47,06%)	68

## 5. RASPRAVA

U našem istraživanju analiziran je utjecaj kirurške antibiotske profilakse na promjenu mikrobioma usne šupljine i utjecaj istoga na razvoj VAP. Bolesnici su primali profilaksu antibioticima koji se obično rabe u jedinicama intenzivne medicine, poput cefazolina, cefuroksima, metronidazola, piperacilina u kombinaciji s tazobaktamom ili kloksacilina, a terapija je prema potrebi promijenjena nakon rezultata antibiograma. Izbor antibiotika bio je u skladu s Hrvatskim nacionalnim smjernicama, Francetić [58] s konkretnim preporukama ovisno o bolnici, vrsti bolesnika i postupcima u svakom JIL. Prva doza primijenjena je sat vremena prije operacije i za elektivne i za hitne kirurške zahvate. Kardiokirurški (AKA) i neurokirurški (AIN) bolesnici primili su samo jednu dozu antibiotika, kirurški bolesnici dobili su antibiotike tijekom 24 sata. Profilaksa u AIK temelji se na primjeni cefazolina, metronidazola ili ciprofloksacina, metronidazola, u AIN cefazolina ili ceftriaksona, dok se u AKA rabi cefuroksim. Izbor antibiotika ovisio je o kliničkoj slici i vrsti operativnog zahvata koji će se primijeniti na to i hoće li to biti ponajprije „čisti“ postupak kao što je operacija lubanje ili srca ili postupci kojima prijeti kontaminacija crijevnom florom kao što su abdominalne operacije. Ceftriakson se općenito ne preporučuje za profilaksu prema hrvatskim smjernicama, ali se rabi u neurokirurškom JIL zbog visoke aktivnosti prema gram-negativnim patogenima povezanim s postoperativnim meningitisom i zbog visokih koncentracija u likvoru. Vankomicin se rabi samo za bolesnike koji su već bili u bolnici ili su došli iz doma za starije ili nemoćne ili su prije imali izolat MRSA. Bolesnici koji su razvili upalu pluća tijekom mehaničke ventilacije i boravka u JIL liječeni su antibioticima u skladu s uzročnikom i rezultatima ispitivanja osjetljivosti.

Ne postoji statistički značajna razlika između antibiotika širokog spektra i antibiotika uskog spektra u smislu selekcije Gram-negativnih bakterija u usnoj šupljini. Nema statističke značajnosti u selekciji GNB između antibiotika širokog spektra (cefuroksim, cefazolin) i antibiotika uskog spektra (ceftriakson, vankomicin, linezolid) što je neočekivano s obzirom da antibiotici širokog spektra uništavaju fiziološku Gram-pozitivnu i anaerobnu floru usne šupljine i gornjeg dišnog sustava. Moguće objašnjenje je relativno mali broj bolesnika koji su primili antibiotike uskog spektra. Ne postoje bibliografski podaci o prethodnim istraživanjima o utjecaju profilaktičkih antibiotika na promjenu mikrobioma usne šupljine.

Gram-negativne bakterije u usnoj šupljini pojavljuju se značajno češće nakon preoperativne profilakse antibioticima. Bolesnici koji su u perioperativnoj profilaksi imali dva ili više antibiotika imali su češće gram-negativnu bakteriju u obrisku usne šupljine i aspiratu traheje.

Rezultati istraživanja koje je proveo Sommerstein i sur. [59] potvrdili su da je u bolesnika koji nisu dobivali antibiotike uzročni agens dobio pristup u orofarinks i prerastao fiziološku floru vrlo rano u tijeku mehaničke ventilacije, već nakon dva dana. Istraživanje je pokazalo da osim antibiotika i sam boravak u JIL i mehanička ventilacija mijenjaju ekološku zajednicu komenzalnih bakterija u gornjem dišnom sustavu i da se mikrobiom mijenjao i u bolesnika koji nisu dobivali antibiotike zbog izlaganja bolničkom okruženju. Dugo se vremena smatralo da je donji dišni sustav sterilan. Uvođenjem novih molekularnih tehnika identificirana je velika raznolikost mikrobne populacije u plućima zdravih osoba koja uključuje bakterije iz roda *Prevotella* spp, *Streptococcus* spp i *Veilonella* spp i ta se bioraznolikost danas smatra biomarkerom respiratornog zdravlja. Našim smo istraživanjem dokazali da nakon endotrahealne intubacije i početka mehaničke ventilacije te uvođenjem antibiotske terapije normalni mikrobiom nestaje te dolazi do kolonizacije gram-negativnim bakterijama koje često mogu biti MDR.

U 50% slučajeva identičan je nalaz trahealnog aspirata i 2. postprofilaktičkog brisa usne šupljine. ROC analizom je utvrđeno da je pozitivna prediktivna vrijednost testa (PPV) 42.51 %. Selecionirana skupina bolesnika kod kojih bi se trebao uzimati postprofilaktički bris usne šupljine su mehanički ventilirani pacijenti s visokim rizikom razvoja VAP i na profilaksi antibioticima.

Zanimljivo je da su iste vrste multirezistentnih bakterija s istim determinantama rezistencije koje su dobivene u postprofilaktičkom brisu prethodno opisane u objavljenim studijama provedenim na istim odjelima Franolić-Kukina i sur. [60] te Bošnjak i sur. [61], što upućuje na to da su ti izolati endemični na tim odjelima i da su vjerojatno godinama preživjeli na neživim površinama i postali izvor kolonizacije bolesnika. Najveći je problem CRAB kojeg u Hrvatskoj ima više od 90% a u novije vrijeme *K. pneumoniae* s OXA-48 karbapenemazom koja je problem za laboratorijsku detekciju zbog varijabilne ekspresije rezistencije na karbapeneme. Velik broj sojeva rezistentan je samo na ertapenem pa lako promakne u rutinskom laboratorijskom radu što olakšava širenje takvih sojeva koje se zbiva preko visoko konjugativnog L plazmida. U našem istraživanju kako je broj sojeva s određenim determinantama rezistencije malen statistika je odrađivana na ukupnom broju multirezistentnih bakterija bez obzira na specifičan mehanizam rezistencije.

Studija Messika i sur. [62] govori da je kolonizacija gram-negativnim bakterijama orofarinksa bila čimbenik rizika za pojavu VAP s istim patogenom: 23% bolesnika s kolonizacijom orofarinksa gram-negativnim bakterijama razvilo je VAP, s istim patogenom; dok se VAP razvio u samo 3,3% bolesnika bez orofaringealne kolonizacije. Naše istraživanje pokazuje da je pojava VAP izrazito povezana s prisutnošću gram-negativnih bakterija u 2. brisu usne šupljine (nakon profilaktičkog antibiotika), upalu pluća dobilo je 42,65% bolesnika koji su imali gram-negativne bakterije u 2. brisu usne šupljine.

U studiji Ewig i sur [63] na 48 neurotraumatskih bolesnika prethodna nazalna ili orofaringealna kolonizacija s tipičnim izvanbolničkim patogenima kao što je *S. pneumoniae*, *S. aureus* i *H. influenzae* neovisan je čimbenik rizika za kolonizaciju dušnika i kasniji rani početak VAP. Za razliku od navedenog istraživanja, u našim rezultatima dominiraju tipični hospitalni patogeni. U naših je bolesnika upala pluća bila izrazito povezana s prisutnošću gram-negativnih bakterija u aspiratu traheje.

Kalanuria i sur. [64] došli su do zaključka da je zbog upotrebe empirijskih antibiotika pri sumnji na VAP moguća prekomjerna upotreba antibiotika, pojava rezistencije, nepotrebnih štetnih učinaka i potencijalne toksičnosti. Glavni ciljevi upravljanja VAP su rani, odgovarajući antibiotici u odgovarajućim dozama, nakon čega slijedi deeskalacija na temelju rezultata mikrobioloških kultura i kliničkog odgovora bolesnika.

MDR bakterijske infekcije povezane su s nižom djelotvornošću empirijskog liječenja antibioticima, češćom eskalacijom antibiotika i duljim trajanjem liječenja [65]. Prema rezultatima našeg istraživanja u bolesnika koji su imali multirezistentni soj bilo je potrebno promijeniti antibiotik (eskalacija, deeskalacija) što je u skladu s istraživanjem Piana i sur. [65] te smo također utvrdili da multirezistentni fenotip bakterije produljuje liječenje u bolnici što je također potvrđeno u istraživanju Piano i sur. [65].

Studije Fengi sur. [66], Cerceo i sur. [67] opisuju epidemiologiju, morbiditet i smrtnost povezane s MDR infekcijama u JIL. Iako raspodjela patogena u JIL ovisi o bolesničkoj populaciji, vrstama operativnog zahvata, dužini boravka u bolnici i politici antibiotika, trend rasta višestruke otpornosti na lijekove sojeva je dosljedan. Čimbenici rizika za kolonizaciju ili infekciju MDR bakterijama uključuju produljeno trajanje boravka u bolnici, boravak u JIL, mehaničku ventilaciju, izloženost antimikrobnim lijekovima širokog spektra, nedavnu operaciju, invazivne postupke i komorbiditete. Infekcije uzrokovane MDR bakterijama u usporedbi s onima koje nisu MDR pridonose većim troškovima hospitalizacije, lošijim

kliničkim ishodima i većoj smrtnosti. Naši su rezultati slični rezultatima navedene studije u smislu da perioperativna profilaksa i mehanička ventilacija povećavaju rizik za nastanak VAP i produljuje liječenje u JIL, a time i troškove zdravstvenog sustava. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je raspodjela patogena u JIL ovisila o populaciji bolesnika, vrstama operativnog zahvata, duljini boravka u bolnici i politici antibiotika. Trend rasta višestruke otpornosti na lijekove sojeva je dosljedan.

Piano i sur. [65] u svojem radu tvrde da brojna profilaktička primjena antibiotika može smanjiti učestalost i smrtnost od VAP, ali može dovesti i do promjena rezistencije patogena na lijekove što otežava liječenje. Weiner i sur. [68] Rhodes i sur. [69] došli su do spoznaje da profilaktička primjena antibiotika može smanjiti učestalost i smrtnost od VAP, ali nesporno je da profilaktička primjena antibiotika može dovesti do promjena rezistencije patogena na lijekove što otežava liječenje. Također su došli do spoznaje da je važno da empirijska antimikrobna terapija bude dobro odabrana u bolesnika s VAP jer su patogeni povezani s neprimjerenom početnom terapijom obično multirezistentni. Prethodna uporaba antibiotika širokog spektra, uključujući  $\beta$ -laktamske antibiotike, identificirana je u mnogim istraživanjima kao čimbenik rizika za kolonizaciju ESBL producirajućim enterobakterijama. Rezistencija na antibiotike među gram-negativnim bakterijama izoliranim kod VAP ozbiljna je prijetnja bolesnicima u JIL. Vardakas i sur.[70] upozoravaju na to da je rezistencija antibiotike eksponencijalno porasla tijekom posljednjeg desetljeća, a izolacija MDR patogena identificirana je kao neovisni prediktor početne neodgovarajuće antibiotske terapije i povećane smrtnosti. Naši rezultati potvrđuju rezultate istraživanja Vardakis i sur.

Medijan životne dobi bolesnika s VAP bio je 70,5, što je sukladno istraživanjima Buta i sur. [71] koje je pokazalo da je prosječna dob bila 70 godina. Slične rezultate pokazuje i studija Chang i sur. [72] i Ding i sur. [73]. Chang i sur. [72] navode da uzroci mogu biti pad fiziološke funkcije disanja, postupna atrofija respiratornih mišića, postupno smanjenje elastičnosti plućnog tkiva, vidljivo oslabljeni zaštitni refleks kašlja, smanjena imunosna funkcija, kronične bolesti te su stoga osjetljiviji na infekciju od mlađih ljudi. Infekcija u starijih osoba povezana je s više kliničkih komplikacija i lošijom prognozom. Isto tako istraživanje Zubair i sur. [74] pokazalo je da ne postoji statistički značajna razlika u dobi između bolesnika s VAP i bez VAP.

Rezultati našeg istraživanja upozoravaju na to da postoji razlika u spolu među bolesnicima s VAP. Udio muških bolesnika bio je statistički značajno veći u odnosu prema ženskom spolu, 80,33% bilo je muškog spola što se poklapa i s istraživanjem Sharpe i sur. [75]. U njihovu je istraživanju bilo 79% muškaraca. Bornstain i sur. [76] u studiji provedenoj na 747 bolesnika

zaključili su da je muški spol neovisan čimbenik rizika za VAP. Forel i sur. [77] dolaze do spoznaje da razlike u riziku od VAP između muškaraca i žena mogu biti povezane s razlikama u spolnim hormonima, učincima polimorfizama rodniha gena na imunosne odgovore lijekova, razlikama u raspodjeli patogena između muškaraca i žena i razlikama u komplikacijama između muškaraca i žena. Rezultati našeg istraživanja slijede rezultate navedenih studija.

Za razliku od istraživanja Piana i sur. [65], u našoj studiji MDR/XDR fenotip nije utjecao na stopu mortaliteta.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je broj sati ventilacije/broja dana liječenja u JIL/broj dana liječenja u bolnici, u bolesnika kod kojih su izolirane gram-negativne bakterije u usnoj šupljini u 2. brisu usne šupljine (poslije antibiotske profilakse) i aspiratu traheje statistički značajno veći nego u bolesnika kod kojih nisu izolirane gram-negativne bakterije. Prisutnost gram-negativnih bakterija u 2. brisu usne šupljine (poslije antibiotske profilakse) i aspiratu traheje produljuje broj sati na ventilatoru, broj dana liječenja u JIL te broj dana hospitalizacije, što je sukladno s istraživanjem Piana i sur. [65].

Najčešći patogeni u našem istraživanju bili su *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii* uz zanemarivi broj gram-pozitivnih uzročnika, dok je u istraživanju Chastre i Fagon [78] u 24 provedene studije, na 1689 uzoraka dobivenih bronhoskopijom, a izoliranih 2490 patogena: utvrđena znatna učestalost MRSA sojeva. U svim je istraživanjima *P. aeruginosa* na prvome mjestu kao uzročnik VAP.

U našem istraživanju pojava rezistentnih GNB u aspiratu traheje povezana je s prethodnim postojanjem *diabetes mellitus* ali ne i s prethodnom kroničnom bubrežnom insuficijencijom. But i sur. [71], Chang i sur. [72] te Jiménez-Trujillo i sur.[79] izvještavaju da kronične bolesti mogu biti čimbenik rizika za VAP, uključujući koronarnu bolest, *diabetes mellitus*, respiratorne bolesti, kronično zatajenje bubrega i Hashimotov tireoiditis. Istraživanje Fabbri i sur. [80] pokazuje da se kronične bolesti javljaju uglavnom u starijih bolesnika i obično ih prati više od jednoga komorbiditeta. Te bolesti zajedno dovode do supresije imunosti uzrokujući oštećenja vitalnih organa poput srca, jetre, bubrega i pluća, čineći bolesnika ranjivijim na infekcije.

#### OGRANIČENJE STUDIJE

Prednost studije je detaljna molekularna analiza izolata, a ograničenje je relativno mali broj bolesnika, činjenica da su svi iz istog bolničkog centra i nedostatak kontrolne skupine koje nije dobivala profilaksu antibioticima.

Sljedeća istraživanja bi trebala odgovoriti na pitanja da li je promjena oralnog mikrobioma posljedica primjene antibiotika ili same mehaničke ventilacije, odnosno boravka u JIL, budući da nismo mogli imati kontrolnu skupinu koja ne bi dobila profilaksu antibioticima.

U literaturi nisu nađene kontrolirane kliničke studije koje bi potvrdile ili opovrgnule naše rezultate.

## 6. ZAKLJUČAK

Istraživanje je pokazalo da bolesnici kolonizirani gram-negativnim bakterijama u usnoj šupljini imaju veći rizik razvoja VAP.

Utvrđena je podudarnost u bakterijskim izolatima iz usne šupljine i aspirata traheje. Postprofilakstički bris usne šupljine kao neinvazivni uzorak mogao bi biti prediktor kolonizacije donjeg dišnog sustava gram-negativnim bakterijama. Pozitivna prediktivna vrijednost postprofilakstičkog brisa je 42%.

Antibiotici širokog spektra (cefuroksim, cefazolin) ne selekcioniraju više gram-negativne bakterije u usnoj šupljini u odnosu prema antibioticima uskog spektra (ceftriakson, vankomicin, linezolid).

Molekularnim metodama kao što je PCR utvrđene su  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra iz ESBL porodice te kabapenem hidrolizirajuće oksacilinaze, OXA-48 u Enterobakterija i OXA-23 like i OXA-24 like u *Acinetobacteria baumannii*.

Prisustvo određenih determinanti rezistencije utječe na potrebu za promjenom antibiotika bilo da se radi o eskalaciji ili deeskalaciji.

Fenotip rezistencije je utjecao na uspjeh odabira empirijske terapije, empirijska terapija je uspješna kod infekcije osjetljivim sojevima, a neuspješna ukoliko se radi o MDR ili XDR soju.



## 7. LITERATURA

1. Ladbrook E., Khaw D., Bouchoucha S., Hutchinson A. A systematic scoping review of the cost-impact of ventilator-associated pneumonia (VAP) intervention bundles in intensive care. *Am J Infect Control*. 2021;49(7):928-936. doi:10.1016/j.ajic.2020.11.027
2. Kohbodi G. A., Rajasurya V., Noor A. Ventilator-associated Pneumonia. 2021 Aug 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
3. Smith H. Z., Kendall B. Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. 2021 Jan 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
4. Jalšovec D. Sustavna i topografska anatomija čovjeka: Usna šupljina, cavum oris, i zubi, dentes. Zagreb: Školska knjiga; 2005.p. 187- 201.
5. Dewhirst F. E., Chen T., Izard J., Paster B. J., Tanner AC, Yu WH, et all. The human oral microbiome. *J. Bacteriol*. 2010 Oct;192(19):5002-17. doi: 10.1128/JB.00542-10
6. <https://repozitorij.mefst.unist.hr/islandora/object/mefst%3A382/datastream/PDF/view>
7. Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry. 5th edition. Elsevier, 2018.
8. Gupta A., Gupta A., Singh T. K., Saxsena A. Role of oral care to prevent VAP in mechanically ventilated Intensive Care Unit patients. *Saudi J Anaesth*. 2016 Jan-Mar;10(1):95-7. doi: 10.4103/1658-354X.169484
9. Gershonovitch R., Yarom N., Findler M. Preventing Ventilator-Associated Pneumonia in Intensive Care Unit by improved Oral Care: a Review of Randomized Control Trials [published online ahead of print, 2020 May 30]. *SN Compr Clin Med*. 2020;1-7. doi:10.1007/s42399-020-00319-8
10. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
11. Kon K. V., Rai M. Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Amsterdam: Elsevier, Academic Pres;2016. p 20.
12. Kakoullis L., Papachristodoulou E., Chra P., Panos G. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(4):415. doi:10.3390/antibiotics10040415

13. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:119-146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.14592
14. Ordulj I., Vuković D., Drenjančević D., Bukovski S. Multirezistentni izolati iz primarno sterilnih materijala bolesnika liječenih u Klinici za pedijatriju i Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek u razdoblju 2008. – 2012. godine. *Infektološki glasnik [Internet].* 2014 [pristupljeno 24.08.2021.];34(3):145-155. Dostupno na:<https://hrcak.srce.hr/138007>
15. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
16. Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 2012;3(3):243-250. doi:10.4161/viru.19700
17. Peleg A. Y., Hooper D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010;362(19):1804-1813. doi:10.1056/NEJMra0904124
18. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP), *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. Page last reviewed;2019.
19. Gužvinec M., Butić I., Jelić M., Bukovski S., Lucić S., Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik [Internet].* 2012 [pristupljeno 14.08.2021.];32(2):71-80.
20. Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J., Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
21. Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(1):42. 2021. doi:10.3390/antibiotics10010042
22. Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z. D., Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens.* 2021;10(3):373. Published 2021. doi:10.3390/pathogens10030373

23. O'Donnell J. N., Putra V., Lodise T. P. Treatment of patients with serious infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: How viable are the current options? *Pharmacotherapy*. 2021; 00: 1– 19. <https://doi.org/10.1002/phar.2607>
24. Fishbain J., Peleg A. Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*. 2010;51(1):79-84. doi:10.1086/653120
25. Suay-García B., Pérez-Gracia M. T. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections, *Antibiotics (Basel)*. 2019 Sep; 8(3): 122. Published online 2019 Aug 19. doi: 10.3390/antibiotics8030122
26. Smith H. Z., Kendall B. Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
27. Mmatli M., Mbelle N. M., Maningi N. E., Osei Sekyere J. Emerging Transcriptional and Genomic Mechanisms Mediating Carbapenem and Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae: a Systematic Review of Current Reports. *mSystems*. 2020;5(6):e00783-20. 2020. doi:10.1128/mSystems.00783-20
28. Rotstein C., Evans G., Born A., et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008;19(1):19-53. doi:10.1155/2008/593289
29. Golia S., Sangeetha K. T., Vasudha C. L. Microbial profile of early and late onset ventilator associated pneumonia in the intensive care unit of a tertiary care hospital in bangalore, India. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(11):2462-2466. doi:10.7860/JCDR/2013/6344.3580
30. Capellier G., Mockly H., Charpentier C., et al. Early-onset ventilator-associated pneumonia in adults randomized clinical trial: comparison of 8 versus 15 days of antibiotic treatment. *PLoS One*. 2012;7(8):e41290. doi:10.1371/journal.pone.0041290
31. Sethi S. *Ventilator-Associated Pneumonia*. University at Buffalo Suny; 2020.
32. Karin A., Peršec J., Bakran K., Pražetina M., Šribar A. Etiologija, incidencija i smrtnost u bolesnika s pneumonijom povezanom s mehaničkom ventilacijom u jedinicama intenzivnog liječenja opće i kardijalne kirurgije u Kliničkoj bolnici Dubrava. *Infektološki glasnik [Internet]*. 2019. [pristupljeno 5.8.2021.];39(4):124-128. <https://doi.org/10.37797/ig.39.4.4>
33. Koenig S. M., Truwit J. D. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):637-657. doi:10.1128/CMR.00051-05

34. Xie X., Lyu J., Hussain T., Li M. Drug Prevention and Control of Ventilator-Associated Pneumonia. *Front Pharmacol.* 2019;10:298. Published 2019 Mar 28. doi:10.3389/fphar.2019.00298
35. Boltey E., Yakusheva O., Costa D. K. 5 Nursing strategies to prevent ventilator-associated pneumonia. *Am Nurse Today.* 2017;12(6):42-43.
36. Enwere E. N., Elofson K. A., Forbes R. C., Gerlach A. T. Impact of chlorhexidine mouthwash prophylaxis on probable ventilator-associated pneumonia in a surgical intensive care unit. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2016;6(1):3-8. doi:10.4103/2229-5151.177368
37. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement. M100-S. Wayne, PA: CLSI: 2016.
38. Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):867-878. doi:10.1093/clinids/10.4.867
39. Lee K., Lim Y. S., Yong D., Yum J. H., Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4623-4629. doi:10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003
40. Walsh T. R., Bolmström A, Qwörnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2755-2759. doi:10.1128/JCM.40.8.2755-2759.2002
41. Pasteran F., Mendez T., Guerriero L., Rapoport M., Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1631-1639. doi:10.1128/JCM.00130-09
42. Elwell, L. P., Falkow S. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. U: Lorian V., ur. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* 2nd edn. Baltimore MD: Williams and Wilkins;1986.
43. Nüesch-Inderbilen M. T., Hächler H., Kayser F. H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and

comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(5):398-402. doi:10.1007/BF01690097

44. Arlet G., Brami G., Décrè D., et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;134(2-3):203-208. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07938.x

45. Woodford N., Ward M. E., Kaufmann M. E., et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735-743. doi:10.1093/jac/dkh424

46. Pagani L., Mantengoli E., Migliavacca R., et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2523-2529. doi:10.1128/JCM.42.6.2523-2529.2004

47. Pérez-Pérez F. J., Hanson N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-2162. doi:10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002

48. Gales A. C., Biedenbach D. J., Winokur P., Hacek D. M., Pfaller M. A., Jones R. N. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;39(2):125-127.

doi:10.1016/s0732-8893(00)00222-4

49. Poirel L., Walsh T. R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

50. Gülmez D., Woodford N., Palepou M. F., et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(6):523-526. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017

51. Woodford N., Fagan E. J., Ellington M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):154-155. doi:10.1093/jac/dki412

52. Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-1590. doi:10.1128/AAC.43.7.1584
53. Robicsek A., Jacoby G. A., Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):629-640.  
doi:10.1016/S1473-3099(06)70599-0
54. Huang T. D., Bogaerts P., Berhin C., et al. Increasing proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and emergence of a MCR-1 producer through a multicentric study among hospital-based and private laboratories in Belgium from September to November 2015. *Euro Surveill.* 2017;22(19):30530.  
doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.19.30530
55. Cannatelli A., D'Andrea M. M., Giani T., et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5521-5526. doi:10.1128/AAC.01480-13
56. Pfeifer Y., Schlatterer K., Engelmann E., et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2125-2128. doi:10.1128/AAC.05315-11
57. Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K. L., Threlfall E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
58. Francetić I. Farmakoterapijski priručnik: 6 th edition. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
59. Sommerstein R., Merz T. M., Berger S. et al. Patterns in the longitudinal oropharyngeal microbiome evolution related to ventilator-associated pneumonia. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;22; 8:81. doi.org/10.1186/s13756-019-0530-6
60. Franolić-Kukina I., Bedenić B., Budimir A., Herljević Z., Vraneš J., Higgins P. G. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int J Infect Dis.* 2011;15(10):e706-e709. doi:10.1016/j.ijid.2011.05.016

61. Bošnjak Z., Bedenić B., Mazzariol A., Jarža-Davila N., Šuto S., Kalenić S. VIM-2  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2010;42:193-197.
62. Messika J., La Combe B., Ricard J. D. Oropharyngeal colonization: epidemiology, treatment and ventilator-associated pneumonia prevention. *Ann Transl Med.* 2018;6(21):426. doi:10.21037/atm.2018.10.17
63. Ewig S., Torres A., El-Ebiary M., et al. Bacterial colonization patterns in mechanically ventilated patients with traumatic and medical head injury. Incidence, risk factors, and association with ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(1):188-198. doi:10.1164/ajrccm.159.1.9803097
64. Kalanuria A. A., Ziai W., Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU [published correction appears in *Crit Care.* 2016;20:29. Zai, Wendy [corrected to Ziai, Wendy]]. *Crit Care.* 2014;18(2):208. Published 2014 Mar 18. doi:10.1186/cc13775
65. Piano S., Singh V., Caraceni P., et al. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology.* 2019;156(5):1368-1380.e10. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.005
66. Feng D. Y., Zhou Y. Q., Zhou M., Zou X. L., Wang Y. H., Zhang T. T. Risk Factors for Mortality Due to Ventilator-Associated Pneumonia in a Chinese Hospital: A Retrospective Study. *Med Sci Monit.* 2019;25:7660-7665. Published 2019 Oct 12. doi:10.12659/MSM.916356
67. Cerceo E., Deitelzweig S. B., Sherman B. M., Amin A. N. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microb Drug Resist.* 2016;22(5):412-431. doi:10.1089/mdr.2015.0220
68. Weiner L. M., Webb A. K., Limbago B., et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37(11):1288-1301. doi:10.1017/ice.2016.174
69. Rhodes N. J., Cruce C. E., O'Donnell J. N., Wunderink R. G., Hauser A. R. Resistance Trends and Treatment Options in Gram-Negative Ventilator-Associated Pneumonia. *Curr Infect Dis Rep.* 2018;20(2):3. Published 2018 Mar 6. doi:10.1007/s11908-018-0609-x

70. Vardakas K. Z., Rafailidis P. I., Konstantelias A. A., Falagas M. E. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug?. *J Infect.* 2013;66(5):401-414. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.028
71. But A., Yetkin M. A., Kanyilmaz D., et al. Analysis of epidemiology and risk factors for mortality in ventilator-associated pneumonia attacks in intensive care unit patients. *Turk J Med Sci.* 2017;47(3):812-816. Published 2017 Jun 12.  
doi:10.3906/sag-1601-38
72. Chang L., Dong Y., Zhou P. Investigation on Risk Factors of Ventilator-Associated Pneumonia in Acute Cerebral Hemorrhage Patients in Intensive Care Unit. *Can Respir J.* 2017;2017:7272080. doi:10.1155/2017/7272080
73. Ding C., Zhang Y., Yang Z., et al. Incidence, temporal trend and factors associated with ventilator-associated pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):468. Published 2017 Jul 4.  
doi:10.1186/s12879-017-2566-7
74. Zubair S., Ali H., Raza S. F., Warind J. A., Beg A. E., Bushra R. Assessment of Frequency and Transience Rate for Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) in Geriatric Patients in Tertiary Care Settings of Karachi, Pakistan. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2018;28(7):536-540. doi:10.29271/jcpsp.2018.07.536
75. Sharpe J. P., Magnotti L. J., Weinberg J. A., et al. Gender disparity in ventilator-associated pneumonia following trauma: identifying risk factors for mortality. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;77(1):161-165. doi:10.1097/TA.0000000000000251
76. Bornstain C., Azoulay E., De Lassence A., et al. Sedation, sucralfate, and antibiotic use are potential means for protection against early-onset ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2004;38(10):1401-1408. doi:10.1086/386321
77. Forel J. M., Voillet F., Pulina D., et al. Ventilator-associated pneumonia and ICU mortality in severe ARDS patients ventilated according to a lung-protective strategy. *Crit Care.* 2012;16(2):R65. Published 2012 Dec 12. doi:10.1186/cc11312
78. Chastre J., Fagon J. Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(7):867-903. doi:10.1164/ajrccm.165.7.2105078



79. Jiménez-Trujillo I., Jiménez-García R., de Miguel-Díez J., et al. Incidence, characteristic and outcomes of ventilator-associated pneumonia among type 2 diabetes patients: An observational population-based study in Spain. *Eur J Intern Med.* 2017;40:72-78. doi:10.1016/j.ejim.2017.01.019

80. Fabbri L., Pauwels R. A., Hurd S. S.; GOLD Scientific Committee. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. *COPD.* 2004;1(1):105-104. doi:10.1081/COPD-120030163

## 8. ŽIVOTOPIS

Vesna Bratić rođena je 1977. u Šibeniku. Diplomirala je 2013. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao magistra sestrinstva. Od 1995. do 2003. radi uKBC-u Zagreb kao medicinska sestra u jedinici intenzivnog liječenja kirurških bolesnika, od 2004. do 2006. kao medicinska sestra na anesteziji. Od 2006. do 2019. radi na mjestu glavne sestre Odjela za anesteziologiju i intenzivno liječenje kirurških i uroloških bolesnika, a od 2020. na mjestu glavne sestre Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje. Godine 2008. izabire se u suradničko zvanje asistenta kao naslovno zvanje na Katedri za zdravstvenu njegu na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Bila je na usavršavanju u St. George's Healthcare NHS, London, Engleska, 2011. godine. Objavila je veći broj stručnih i znanstvenih radova u zemlji i inozemstvu, trenutačno radi na poglavljima u knjizi vezano za anesteziologiju i intenzivno liječenje.

Objavljeni radovi u časopisima:

1. Naslov: Gram-negative bacteria as causative agents of ventilator-associated pneumonia and their respective resistance mechanism

Autori: Bandić-Pavlović D., Zah Bogović T., Zizek M., Bielen L., Bratić V., Hrabac P., Slacanac D., Mihaljević S., Bedenić B.

Časopis: Journal of chemotherapy

Q i prema WoS i prema Scopusu: Q3

2. Naslov: Prophylactic application of antibiotics selects extended spectrum beta-lactamase and carbapenemases producing Gram. Negative bacteria in the oral cavity

Autori: Bratić V., Mihaljević S., Veržak Z., Plesko E., Lukić A., Cacic M., Bedenić B.

Časopis: Letters in applied microbiology

Q i prema WoS i prema Scopusu: Q2

Rad proizašao iz doktorata.