

# Cefalosporinaze u izolatima bakterije *Proteus mirabilis* iz domova za starije i nemoćne te izvanbolničkih pacijenata

---

**Meštrović, Tomislav; Lukić-Grlić, Amarela; Bogdan, Maja; Bandić-Pavlović, Daniela; Cavrić, Gordana; Drenjančević, Domagoj; Sreter, Katherina Bernardette; Benčić, Ana; Sardelić, Sanda; Bedenić, Branka**

*Source / Izvornik:* **Acta medica Croatica : Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, 2018, 72, 285 - 294**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:220:812381>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Sestre milosrdnice University Hospital Center - KBCSM Repository](#)

## CEFALOSPORINAZE U IZOLATIMA BAKTERIJE *PROTEUS MIRABILIS* IZ DOMOVA ZA STARIJE I NEMOĆNE TE IZVANBOLNIČKIH PACIJENATA

TOMISLAV MEŠTROVIĆ<sup>1</sup>, AMARELA LUKIĆ-GRLIĆ<sup>2,3</sup>, MAJA BOGDAN<sup>4</sup>, DANIELA BANDIĆ-PAVLOVIĆ<sup>5</sup>, GORDANA CAVRIĆ<sup>6</sup>, DOMAGOJ DRENJANČEVIĆ<sup>7,8</sup>, KATHERINA BERNARDETTE SRETER<sup>9</sup>, ANA BENČIĆ<sup>2</sup>, SANDA SARDELIĆ<sup>10</sup> i BRANKA BEDENIĆ<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Poliklinika "Dr. Zora Profozić", Jedinica za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju, Zagreb, Hrvatska, <sup>2</sup>Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska, <sup>3</sup>Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Hrvatska, <sup>4</sup>Služba za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek, Hrvatska, <sup>5</sup>Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska, <sup>6</sup>Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska, <sup>7</sup>Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek, Hrvatska, <sup>8</sup>Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska, <sup>9</sup>Klinički bolnički centar "Sestre milosrdnice", Zagreb, Hrvatska, <sup>10</sup>Klinički bolnički centar Split, Split, Hrvatska

*Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) je sve značajniji uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe. Prethodna istraživanja rezistencije u *P. mirabilis* u Hrvatskoj su pokazala dominaciju TEM-52 beta-laktamaze proširenog-spektra (ESBL) i pojavu plazmidnih AmpC beta-laktamaza. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi evoluciju i dinamiku pojavljivanja cefalosporinaza u *P. mirabilis* u domovima umirovljenika te usporediti izolate iz domova s onima u izvanbolničkoj populaciji. Ukupno je prikupljen 41 izolat rezistentan na cefalosporine treće generacije iz dva doma za starije i nemoćne te od izvanbolničkih pacijenata u razdoblju od ožujka 2015. do rujna 2017. godine. Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je metodom dilucije u bujonu. ESBL i plazmidne AmpC beta-laktamaze su detektirane fenotipskim testovima s inhibitorima te metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Plazmidi su karakterizirani konjugacijom, transformacijom i replikon-tipizacijom. Svi izolati su pokazivali visoki stupanj rezistencije na amoksisilin te na cefalosporine prve, druge i treće generacije. Tri izolata su pokazivala pozitivan test dvostrukog diska i kombiniranih diskova s klavulanskom kiselinom, što je upućivalo na produkciju ESBL. Trideset-osam izolata je bilo negativno fenotipski na ESBL ali su imali pozitivan Hodgeov test i test kombiniranih diskova s fenilboroničnom kiselinom, što je upućivalo na produkciju AmpC beta-laktamaze. PCR-om su dokazane CTX-M i TEM beta-laktamaze u ESBL-pozitivnih izolata i CMY u izolata pozitivnih na AmpC. U CTX-M pozitivnim izolatima identificiran je plazmid iz IncK grupe, dok AmpC-pozitivni sojevi nisu posjedovali plazmid. Ovim istraživanjem dokazali smo perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima ove bakterijske vrste u jednom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu te u izvanbolničkoj populaciji. Kao i u nekim drugim istraživanjima, uočen je trend skretanja beta-laktamaza od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima. Shodno tome, pravilna i brza laboratorijska identifikacija tipa cefalosporinaze postaje sve važniji preduvjet za odabir adekvatne terapije.

**Ključne riječi:** cefalosporinaze – genetika; cefalosporini – farmakologija; *Proteus mirabilis* – genetika; bakterijska otpornost na lijekove – djelovanje lijeka, genetika; beta-laktamaze – genetika, metabolizam; plazmidi – analiza, genetika; testovi osjetljivosti mikroorganizama; Hrvatska – epidemiologija

**Adresa za dopisivanje:** Prof. dr. sc. Branka Bedenić, dr. med.  
Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
KBC Zagreb  
10 000 Zagreb, Hrvatska  
Kišpatićeva 12  
E-pošta: branka.bedenic@mef.hr

## UVOD

*Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae* koja je značajan uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe (1). Najčešće uzrokuje infekcije mokraćnog sustava i rana. Značajan terapijski problem jest sve veći postotak višestruko otpornih, tj. multirezistentnih izolata *P. mirabilis* zbog produkcije beta-laktamaza proširenog spektra i AmpC beta-laktamaza, a u novije vrijeme i karbapenemaza (2-4).

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) hidroliziraju cefalosporine treće i četvrte generacije te monobaktame, a osjetljive su na inhibitore kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (3,5-8). TEM i SHV beta-laktamaze proširenog spektra nastaju od parentalnih TEM-1, TEM-21 i SHV-1 beta-laktamaza širokog spektra mutacijama koje mijenjaju konfiguraciju aktivnog središta i šire spektar djelovanja enzima (8). Za razliku od njih, CTX-M beta-laktamaze su nativne ESBL, a nastale su od kromosomskih beta-laktamaza vrste *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana* (9).

Prva CTX-M beta-laktamaza bila je CTX-M-1 opisana još u Njemačkoj 1995. godine („cefotaximase-Munich“). Prema važećoj klasifikaciji dijele se u pet skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (9, 10). U skupini 1 postoji više alelskih varijanti, a najčešća je CTX-M-15. Za razliku od većine TEM i SHV varijanti bolje hidroliziraju cefotaksim nego ceftazidim. Nadalje, AmpC beta-laktamaze hidroliziraju treću generaciju cefalosporina, monobaktame i cefamicine, ali ne djeluju na cefalosporine četvrte generacije. Za razliku od ESBL nisu osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom (11). *P. mirabilis* nema kromosomsku AmpC beta-laktamazu pa je rezistencija na cefoksitin u te vrste obično uzrokovana plazmidnim AmpC beta-laktamazama (12).

U prethodnom multicentričnom istraživanju u Europi utvrđeno je da je produkcija CMY beta-laktamaza najčešći mehanizam rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u *P. mirabilis* (13) s dominacijom CMY-12 i CMY-14 varijante u Poljskoj (14), CMY-16 u Grčkoj i u Italiji (13), CMY-4 u Tunisu (15) i CMY-99 u Bugarskoj (16). Izolati s CMY-16 beta-laktamazom uzrokovali su epidemiju infekcija mokraćnog sustava u domu za starije u Italiji (17). Osim AmpC beta-laktamaza, i ESBL mogu dovesti do rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u izolata *P. mirabilis* (18). Starija istraživanja su pokazala dominaciju TEM-10 i TEM-

52 beta-laktamaze u Europi (19-21). U novije vrijeme zapažen je porast CTX-M varijanti u *P. mirabilis*, kao i u ostalih enterobakterija (12,22,23).

Prethodna istraživanja rezistencije u *P. mirabilis* u Hrvatskoj su pokazala dominaciju TEM-52 beta-laktamaze proširenog-spektra u KBC-u Split (24, 25) i CMY-16 u domu za starije i nemoćne osobe „Godan“ u Zagrebu (26). U susjednoj Bosni i Hercegovini također su opisane CMY-2 i CTX-M-15 (27).

Domovi za starije i nemoćne općenito su značajan rezervoar multirezistentnih enterobakterija. Bolesnici koji borave u domovima često bivaju hospitalizirani i kolonizirani multirezistentnim izolatima za vrijeme boravka u bolnici. Nadalje, sve je veći trend propagacije ESBL i AmpC beta-laktamaza u izvanbolničku sredinu (29). U prethodnom istraživanju provedenom na izolatima iz doma Godan u Zagrebu utvrđena je visoka stopa AmpC beta-laktamaza iz CMY porodice (26). Cilj ovog istraživanja bio je usporediti molekularni profil rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u izolata prikupljenih iz dva doma za starije i nemoćne u Zagrebu s onima u izvanbolničkim izolatima kako bi se utvrdili mehanizmi i putovi širenja.

## MATERIJALI I METODE

### Bakterijski izolati

U vremenskom razdoblju od ožujka 2015. godine do rujna 2017. godine prikupljen je ukupno 3321 izolat bakterije *P. mirabilis* iz izvanbolničkih uzoraka i iz domova umirovljenika, od čega je 41 izolat (1,23 %) bio rezistentan na cefalosporine treće generacije (ceftazidim, cefotaksim ili ceftriakson). Izolati su skupljeni iz različitih bolesničkih uzoraka, i to iz dva doma za starije i nemoćne osobe te od vanjskih bolesnika čiji su uzorci obrađivani u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Zagreb. Iz prvog doma (na tablici 1 označenog kao dom A) prikupljeno je 25 izolata, iz drugog doma (na tablici 1 označen kao dom B) dva izolata, dok je od vanjskih pacijenata prikupljeno 14 izolata. Pet izolata je potjecalo iz obrisaka rana, jedan iz iskašljaja (sputuma), a svi ostali iz urina. Izolati su identificirani konvencionalnim mikrobiološkim biokemijskim testovima te potvrđeni MALDI-TOF metodom masene spektrometrije (Microflex™ Maldi Bio-typer MS, Bruker-Daltonik, Fremont, CA, SAD; korišteni softver: MALDI BIOTYPER version 3.1., Build 65).

Tablica 1.

Minimalne inhibitorne koncentracije različitih antimikrobnih lijekova i tipovi beta-laktamaza izolata *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) iz dva doma za starije i nemoćne (1A, 1B) te izvanbolničke populacije (1C)

1A. Dom za starije i nemoćne

Broj o	Godina izolacije	Uzorak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	FOX	CRO	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2015.	Urin	2015042665	≥128	32	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	1	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2015.	Urin	2015046074	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,5	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
3	2015.	Iskašljaj	2015086441	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	2	0,5	1	32	≥128	-	+	CMY, TEM
4	2015.	Urin	2015087514	≥128	32	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,5	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
5	2015.	Urin	2015078518	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
6	2015.	Urin	2015117676	≥128	≥128	32	≥128	≥128	64	16	4	8	16	0,12	0,12	1	64	≥128	+	-	TEM
7	2015.	Urin	2014162797	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
8	2015.	Urin	2015221956	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	0,5	0,12	0,5	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
9	2016.	Urin	2016024787	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	1	1	64	≥128	-	+	CMY
10	2016.	Obrisak rane	51926	≥128	64	16	≥128	≥128	16	≥128	8	≥128	16	1	0,25	0,5	32	0,5	+	-	CTX-M, TEM
11	2016.	Urin iz katetera	110160	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,06	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
12	2016.	Urin	25390	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
13	2016.	Urin	54382	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,06	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
14	2016.	Obrisak rane	161241	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	2	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
15	2016.	Urin	6172449	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,25	2	64	≥128	-	+	CMY, TEM
16	2016.	Urin	6228367	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
17	2017.	Urin	7004595	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	0,25	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
18	2017.	Urin iz katetera	6008079	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	1	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
19	2017.	Obrisak rane	7033979	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
20	2017.	Urin	35792	≥128	32	64	≥128	≥128	≥128	≥128	4	≥128	64	0,5	0,12	1	64	≥128	+	+	CTX-M, TEM
21	2017.	Obrisak rane	64548	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
22	2017.	Urin	66550	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	0,5	0,12	0,5	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
23	2017.	Obrisak rane	74409	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
24	2017.	Urin	2015154570	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
25	2017.	Urin	165729	≥128	≥128	64	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM

1B. Dom za starije i nemoćne osobe

Broj o	Godina izolacije	Uzorak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	FOX	CRO	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2016.	Urin	67410	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	4	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2017.	Urin	76324	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,25	1	1	≥128	-	+	CMY, TEM

## 1C Vanjski pacijenti

Broj o	Godina izolacije	Uzrak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	CRO	FOX	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2015.	Urin	2015057631	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2015.	Urin	2014064696	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,25	0,5	0,5	2	-	+	CMY, TEM
3	2015.	Urin	2015074408	≥128	≥128	4	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY
4	2015.	Urin iz katetera	2015080157	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	0,5	2	≥128	-	+	CMY, TEM
5	2015.	Urin	2015110887	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	1	0,25	1	4	≥128	-	+	CMY, TEM
6	2016.	Urin	41644	≥128	≥128	64	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	32	2	0,06	4	4	≥128	-	+	CMY, TEM
7	2016.	Urin	47071	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,06	1	0,5	≥128	-	+	CMY, TEM
8	2016.	Urin	51896	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	8	≥128	-	+	CMY, TEM
9	2016.	Urin	6103301	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,25	0,5	16	≥128	-	+	CMY, TEM
10	2016.	Urin	55311	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	0,06	0,5	1	≥128	-	+	CMY, TEM
11	2016.	Urin	6233394	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	0,5	2	≥128	-	+	CMY, TEM
12	2017.	Urin	6013040	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,5	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
13	2017..	Urin	32252	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	32	2	0,12	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
14	2017.	Urin	65269	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	0,5	0,25	≥128	-	+	CMY, TEM

Kratice: AMX-amoksilin; TZP-piperacilin/tazobaktam; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; CTX-cefotaksim; CRO-ceftriakson; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; IMI-imipenem; MEM-meropenem; GM-gentamicin; CIP-ciprofloksacin; ESBL-fenotipski test s klavulanskom kiselinom za dokaz beta-laktamaza proširenog spektra, AmpC-fenotipski test s feniloboroničnom kiselinom za dokaz AmpC beta-laktamaza; BL-sadržaj beta-laktamaza

### Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove rađeno je disk-difuzijskom metodom i bujonskom mikrodilucijskom metodom prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*Clinical & Laboratory Standards Institute*; CLSI) (29). Izolati su testirani disk difuzijskom metodom po Kirby-Baueru na Mueller-Hintonovom (MH) agaru na sljedeće antimikrobne lijekove (BioRad, Francuska): amoksilin (30 mcg), ko-amoksiklav (20/10 mcg), cefuroksim (30 mcg), ceftazidim (30 mcg), cefepim (30 mcg), cefotaksim (30 mcg), ceftriakson (30 mcg), cefoksitin (30 mcg), piperacilin/tazobaktam (100/10 mcg), imipenem (30 mcg), meropenem (30 mcg), gentamicin (10 mcg), amikacin (30 mcg) i ciprofloksacin (30 mcg). Rezultati su interpretirani prema smjernicama CLSI-a (29). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je određivana metodom dilucije u bujonu u mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica te u Mueller-Hintonovom bujonu. Za kontrolu kvalitete korišteni su

kontrolni sojevi *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 i *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 700603 kao standardno preporučeni standardni kontrolni sukladno uputama CLSI-a (29). Sojevi su karakterizirani kao multirezistentni, ekstenzivnerezistentni ili panrezistentni prema kriterijima Magiorakos i suradnika (30).

### Fenotipski testovi za detekciju beta-laktamaza

Izolati rezistentni na cefalosporine proširenog spektra podvrgnuti su testiranju na produkciju ESBL. Sumnja na produkciju plazmidnih AmpC beta-laktamaza postavljena je na temelju rezistencije na cefoksitin.

### Metoda dvostrukog diska

Prekonočna kultura testiranog soja je razrijeđena tako da se dosegne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5, što odgovara za 10<sup>8</sup> CFU/mL. To razrijeđenje je zasijano na Mueller-Hintonov

agar, a zatim su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima. U sredinu ploče je stavljen disk ko-amoksiklava kao izvor klavulanske kiseline na udaljenosti 2-3 cm od perifernih diskova. Ploče su inkubirane 18-24 h na 35-37 °C. Deformacija inhibicijske zone oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama u smjeru prema centralnom disku s klavulanskom kiselinom tumačena je kao pozitivan rezultat koji ukazuje na produkciju ESBL-a (31).

#### Metoda kombiniranih diskova po CLSI-u za detekciju ESBL i AmpC beta-laktamaza

Prekonoćna kultura testiranog izolata pripremljena je kao i za prethodnu metodu te zasijana na Mueller-Hintonov agar. Na ploču su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama – s dodatkom i bez dodatka klavulanske kiseline za detekciju ESBL te fenilboronične kiseline za detekciju AmpC beta-laktamaze. Klavulanska kiselina je kapana na površinu diska u koncentraciji od 10 000 µg/mL. Ploče su zatim inkubirane 18-24 h na 35-37 °C. Inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču bez klavulanske kiseline dokazala je produkciju ESBL, a uz fenilboroničnu kiselinu AmpC beta-laktamaze (29, 32).

#### Hodgeov test

*E. coli* ATCC 25922 (osjetljivi soj) zasijana je u Mueller-Hintonov bujon i inkubirana preko noći. Prekonoćna kultura je razrjeđivana u fiziološkoj otopini tako da se dobije gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5 te zatim zasijavana na Mueller-Hintonov agar na koji je stavljen disk cefoksitina. Okomito na disk povučena je crta testiranog izolata. Ploče su inkubirane preko noći. Ako je izolat proizvodio AmpC beta-laktamazu, uočeno je uvrtnje inhibicijske zone oko diska cefoksitina u obliku lista djeteline (29).

#### Prijenos rezistencije metodom konjugacije

Prijenos rezistencije na ceftazidim testiran je metodom konjugacije u bujonu (33). Kao recipijent korišten je soj *E. coli* J62 rezistentan na natrijev azid. Donori i recipijent su inokulirani u srčano-moždani infuzijski bujon, inkubirani 4-6 sati (do kasne eksponencijalne faze) i zatim zasijani u omjeru 1:2 u 5 mL srčano-moždanog infuzijskog bujona. Mješavina donora i recipijenta inkubirana je preko noći te zasijavana na selektivne podloge. Transkonjuganti su selekcionirani na MacConkey agaru koji sadržava cefotaksim (2 mg/L) i/ili natrijev azid (100 mg/L). Testiran je i ko-transfer rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike kao što su aminoglikozidi, tetraciklin, kloramfenikol, sulfonamidi i trimetoprim s obzirom da se geni rezistencije na

te antibiotike često nalaze na istom plazmidu kao i gen koji kodira ESBL. Frekvencija prijenosa je određivana relativno u odnosu na broj stanica donora.

#### Detekcija gena rezistencije

Geni koji kodiraju beta-laktamaze širokog i proširenog spektra ( $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$  i  $bla_{PER-1}$ ) (34-36), plazmidne AmpC β-laktamaze (37) i rezistenciju na fluorokinolone ( $qnrA$ ,  $qnrB$ ,  $qnrS$ ) određivani su primjenom lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain reaction*; PCR) kao što je prethodno opisano. Skupina CTX-M beta-laktamaza određivana je multiplex PCR-om prema Woodford i suradnicima (38). PCR-mapiranje učinjeno je s početnicama za insercijske sekvence IS26 i *ISEcp1* u kombinaciji s uzvodnom i nizvodnom početnicom (*forward primer* i *reverse primer*) za  $bla_{CTX-M}$  ili  $bla_{CTX-M}$  gen kako bi se dokazala prisutnost insercijske sekvence ispred ili iza gena. Detekcija PCR produkata učinjena je elektroforezom u agarozu gelu s naknadnim bojenjem etidijevim bromidom. Vizualizacija produkata učinjena je pod ultraljubičastim (UV) transiluminatorom. Amplikoni pojedinih predstavnika pročišćeni su na kolonama *Qiagen Purification Kit* (Qiagen, Njemačka) i zatim sekvencirani u oba smjera u Eurofin servisu (Ebersberg, Njemačka). Sekvence nukleotida i aminokiseline koje proizlaze iz njih analizirane su pomoću Blast programa na stranici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Identifikacija mutacija u  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$  i  $bla_{CTX}$  genima temeljena je na: Bush K, Jacoby GA. *Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β-lactamases*. Lahey Clinic; 2002. Dostupno na <http://www.lahey.org/studies/>.

#### Karakterizacija plazmida

Plazmidi su ekstrahirani *Qiagen Mini Kitom* (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača te podvrgnuti elektroforezi u agarozu gelu (0,7 %) s naknadnim bojenjem etidijevim bromidom. Veličina vrpce je uspoređivana s vrpčama kontrolnog soja *E. coli* NTCC 50192 koji ima četiri vrpce od 148, 64, 36 i 7 kilobaza. Plazmidi su zatim podvrgnuti multiplex PCR-u za određivanje inkompatibilne skupine prema Carattoli i sur. (39). Plazmidi reprezentativnih sojeva (1, 4 i 7) podvrgnuti su pokusu transformacije. Plazmidna DNA prenešena je na *E. coli* soj J62 koji je prethodno obrađen kalcijevim kloridom (CaCl) da bi mogao primiti plazmid. Transformanti su selekcionirani na podlozi koja je sadržavala 2 mg/L cefotaksima (33).

## REZULTATI

### Osnovni sociodemografski profil bolesnika

Od ukupno 41 izolata bakterijske vrste *P. mirabilis* rezistentne na cefalosporine treće generacije koji su prikupljeni iz dva doma za starije i nemoćne osobe te od izvanbolničkih pacijenata, 24 izolata pronađeno je kod ženskih pacijenata (58,54 %), a 17 izolata kod muških pacijenata (41,46 %). Raspon godina ženskih pacijenata bio je 71-94 (srednja vrijednost: 84,71; medijan: 84,5), a muških pacijenata 64-96 (srednja vrijednost: 80,12; medijan: 81). Raspon godina svih pacijenata (dakle, i muških i ženskih) od kojih su dobiveni izolati bio je 64-

96 (srednja vrijednost: 82,80; medijan: 83; mod: 94).

### Rezultati testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove i fenotipska detekcija beta-laktamaza

Svi su izolati pokazivali visoki stupanj rezistencije na amoksisilin i cefalosporine prve, druge i treće generacije (tablica 1 i 2). Tri su izolata pokazivala pozitivan test dvostrukog diska i kombiniranih diskova s klavulanskom kiselinom, što je upućivalo na produkciju ESBL. Trideset-osam izolata bilo je negativno fenotipski na ESBL, ali su imali pozitivan Hodgeov test i test kombiniranih diskova s fenilboroničnom kiselinom, što je upućivalo na produkciju AmpC beta-laktamaze.

Tablica 2.

Distribucija minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK-ova) različitih antimikrobnih lijekova za CMY-pozitivne izolate *P. mirabilis*. Sjenčanjem su označene prijelomne točke prema CLSI-u (27); vrijednost MIK-a istoznačna ili veća od prijelomne točke ukazuje na rezistenciju.

ATB	Postotak izolata inhibiranih uz određenu koncentraciju antibiotika												
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
AMX													100%
AMC										5,263%			94,737%
TZP							2,632%	13,158%	26,316%	50%	5,263%		2,632%
CZ													100%
CXM													100%
CAZ													100%
CTX													100%
CRO													100%
FEP							10,526%	28,947%	55,263%	5,263%			
IMI				21,053%	39,474%	39,474%							
MEM	13,158%	34,211%	34,211%	10,526%	7,895%								
ERT				28,947%	52,632%	15,789%	2,632%						
GM			2,632%	5,263%	5,263%	5,263%	7,895%	2,632%	2,632%	10,526%	13,158%		44,737%
CIP						2,632%							97,368%

Tri ESBL-pozitivna izolata su iskazivala rezistenciju na amoksisilin, ko-amoksiklav, cefazolin, cefuroksim i gentamicin, kao i varijabilne MIK-ove ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima, kao što je vidljivo iz tablice 1. Svi su bili osjetljivi na karbapeneme i piperacilin/tazobaktam. Nadalje, svi AmpC-pozitivni sojevi bili su rezistentni na amoksisilin, ko-amoksiklav, cefazolin, cefuroksim, ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson. Visoke stope rezistencije zabilježene su i za ciprofloksacin (97,4 %) i gentamicin (73,7 %) (tablica

2). Svi sojevi bili su osjetljivi na karbapeneme, a samo dva su bila rezistentna na cefepime (5,3 %) te jedan na piperacilin/tazobaktam (2,6 %) (tablica 2). Svi izolati iz mokraće bili su rezistentni na sulfametoksazol/trimetoprim i nitrofurantoin u disk-difuzijskom testu.

### Rezultati konjugacije

Ukupno su tri izolata prenijela rezistenciju na ceftazidim na *E. coli* recipijent uz frekvenciju od  $10^{-7}$  do  $10^{-5}$ .

Sva tri su bila fenotipski pozitivni na ESBL. Transkonjuganti su pokazivali smanjenu osjetljivost na cefalosporine treće i četvrte generacije, a također je prenešena i rezistencija na sulfometoksazol/trimetoprim, kloramfenikol i tetraciklin (a u jednog soja također i na gentamicin). AmpC-pozitivni izolati nisu prenijeli rezistenciju na ceftotaksim na recipijent.

#### Detekcija gena rezistencije

Od tri izolata fenotipski pozitivna na ESBL, dva su producirala CTX-M beta-laktamazu iz skupine 1, a jedan TEM beta-laktamazu. U svih sojeva fenotipski pozitivnih na AmpC je PCR-om identificirana CMY beta-laktamaza i dodatna TEM beta-laktamaza koja je u jednom soju (soj br. 2) identificirana kao TEM-1. Sekvenciranje *bla*<sub>CTX-M</sub> gena soja br. 1 je identificiralo CTX-M-15 beta-laktamazu, a *bla*<sub>CMY</sub> gena soja br. 2 CMY-16 alelsku varijantu. *ISEcp* je identificirana ispred *bla*<sub>CMY</sub> i *bla*<sub>CTX-M</sub> gena. *Qnr* geni nisu pronađeni.

#### Karakterizacija plazmida

Dva izolata s CTX-M beta-laktamazom su imala plazmid veličine od 100 do 110 parova baza koji je spadao u IncK grupu, dok svi ostali (CMY pozitivni) nisu imali vrpce na elektroforezi plazmida te su bili negativni na plazmidne inkompatibilne dosada opisane tipove. CMY-pozitivni sojevi koji nisu prenijeli rezistenciju na cefotaksim u pokusu konjugacije također nisu prenijeli plazmid ni u pokusu transformacije. S obzirom da su ESBL pozitivni sojevi proizveli transkonjugante u pokusu konjugacije nije ih bilo potrebno podvrgavati transformaciji.

## RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja ukazali su na perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima bakterije *P. mirabilis* u obuhvaćenom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu te u izvanbolničkoj populaciji. CMY cefalosporinaze su u *P. mirabilis* prethodno opisane, osim u domu za starije i nemoćne osobe Godan u Zagrebu, također i u Kliničkom bolničkom centru Split te u izolatima bakterije *E. coli* od kućnih ljubimaca (26,40,41).

U usporedbi s prethodnim istraživanjima u Hrvatskoj, u domu A su se u ovom istraživanju osim AmpC-pozitivnih izolata također pojavili i izolati koji proizvode ESBL, i to predominantno iz CTX-M porodice. Većina bolesnika je prethodno boravila u nekom od velikih bolničkih centara u Zagrebu gdje su vjerojatno prethodno kolonizirani takvim izolatima koje su unijeli u dom, nakon čega je došlo do njihove diseminacije pod

seleksijskim učinkom antibiotika koji se učestalo propisuju u gerijatrijskoj populaciji.

Prema našim saznanjima u literaturi dosad nisu objavljeni podatci o karakterizaciji hospitalnih ESBL ili AmpC-pozitivnih izolata *P. mirabilis* u Hrvatskoj. Nadalje, ovo istraživanje donosi prvi opis CTX-M-15 beta-laktamaze u izolatu *P. mirabilis* u Hrvatskoj. U prethodnim istraživanjima opisana je u *E. coli* izolatima iz KBC-a Zagreb (Rebro) (42,43) i izvanbolničkim izolatima *K. pneumoniae* (44). Također je opisana kao dodatna beta-laktamaza u izolatima *K. pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* pozitivnim na metalo-beta-laktamaze iz porodice VIM i NDM (45-47). Urinarni trakt se pokazao kao najvažniji rezervoar multirezistentnih izolata, što se poklapa s rezultatima studija drugih autora. Pretežno su bile zahvaćene osobe s trajnim urinarnim kateterima, a čak su i u vanjskoj populaciji prevladavale osobe starije životne dobi.

CMY beta-laktamaze su tipične plazmidne beta-laktamaze u enterobakterija koje vuku podrijetlo od kromosomskog gena *ampC* bakterijske vrste *Citrobacter freundii* (49). Iako su one tipično plazmidno kodirane, u ovom istraživanju nismo uspjeli dokazati plazmidno podrijetlo gena. Rezistencija na cefotaksim nije prenešena na recipijent ni u pokusu konjugacije, a ni transformacijom, a PCR za inkompatibilne skupine plazmida bio je negativan. Neka istraživanja su dokazala da je došlo do inkorporacije plazmidnog gena u kromosom preko *ISEcp* insercijske sekvence (13), ali u našem istraživanju nije sa sigurnošću potvrđena kromosomska lokacija gena *CMY*. Dodatne bi analize pomoću metoda *Southern blotting* i S1-PFGE bile potrebne da se razjasni točna lokacija gena. CMY beta-laktamaze su, osim u proteusa, opisane i u izolata bakterije *K. pneumoniae* (50). Nadalje, CMY-16 beta-laktamaza je prethodno opisana u izolatima *P. mirabilis* koji su uzrokovali infekcije urinarnog trakta u jednom domu u Italiji, kao i u domu Godan u Zagrebu (13, 26). U ovom istraživanju je zapažen gotovo identičan fenotip rezistencije kod svih CMY-pozitivnih izolata, neovisno o njihovom podrijetlu, za razliku od ESBL izolata koji su iskazivali varijabilan fenotip rezistencije i na cefalosporine i na ostale antibiotike. Osim toga, zapažena je dobra korelacija između fenotipskih testova s inhibitorom (klavulanska i fenilboronična kiselina) i rezultata PCR-a – dakle, može se zaključiti da su fenotipski testovi pokazali vrlo visoku osjetljivost i specifičnost. Svi fenotipski ESBL-pozitivni sojevi su davali produkt s početnicama za beta-laktamaze proširenog spektra, dok su svi fenotipski pozitivni sojevi na AmpC davali produkt s početnicama za CMY. Nije bilo lažno pozitivnih rezultata.

Ova studija pokazuje slične trendove u dinamici rezistencije na cefalosporine proširenog spektra koji su



prethodno opisani i u ostalim europskim zemljama – konkretno, skretanje od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima u važnog izvanbolničkog patogena kao što je *P. mirabilis* (13,51,52). Uz to, iznimno visoke stope rezistencije na ciprofloksacin i gentamicin, kao i potpuna rezistencija na sulfometoksazol/trimetoprim detektirani su i u ESBL i u AmpC-pozitivnih sojeva. Potonje se tumači činjenicom da plazmidi koji kodiraju i jedne i druge beta-laktamaze često sadržavaju i gene rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike. Shodno tome, postoji i mogućnost korištenja gotovih diskova koji sadržavaju fenilboroničnu kiselinu što olakšava testiranje (53).

Precizna laboratorijska identifikacija točnog tipa beta-laktamaze je svakako važna pri pravilnom odabiru terapije (3,54). S terapijskog aspekta za infekcije koje uzrokuju ESBL-pozitivni izolati bi se mogli preporučiti samo karbapenemi ili piperacilin/tazobaktam, dok za AmpC izolate dolazi u obzir i cefepim. Potonji izbor antibiotika tumači se činjenicom da AmpC beta-laktamaze ne hidroliziraju cefepim, iako podatci iz literature navode da je sporna primjena i cefepima zbog mogućnosti razvoja hiperproducerskih u toku terapije koji luče velike količine AmpC beta-laktamaze i imaju smanjenu osjetljivost i na cefepim (55).

Antimikrobni lijekovi koji se često koriste u terapiji infekcija mokraćnog sustava, kao što su fluorokinoloni i kotrimoksazol, pokazali su se potpuno neučinkovitim – kako u ESBL, tako i u AmpC-pozitivnih izolata. Naši ESBL-pozitivni izolati pokazivali su varijabilnu osjetljivost na cefalosporine treće i četvrte generacije; s druge strane, AmpC-pozitivni izolati su bili uniformno rezistentni na treću generaciju, a osjetljivi na četvrtu generaciju cefalosporina. Treba napomenuti kako za AmpC-pozitivne izolate ne postoje preporuke za korekciju antibiograma, premda neki autori preporučuju treću generaciju cefalosporina izdati kao rezistentnu, a četvrtu generaciju cefalosporina sukladno rezultatima testiranja *in vitro* (56).

Daljnja istraživanja ove teme trebala bi se također kretati u smjeru usporedbe genotipova bolničkih i izvanbolničkih izolata (ne samo od bolesnika, nego i iz okoliša) pomoću metoda molekularne epidemiologije te razumijevanja evolucije rezistencije kako bi se proučio potencijalni rezervoar infekcije, ali i mehanizmi te putovi širenja ovog važnog patogenog mikroorganizma. To bi omogućilo i lakše uvođenje preventivnih mjera te uspostavljanje kontrole širenja, a napose probira (skrininga) bolesnika koji dolaze u dom za starije osobe iz bolnice i obrnuto. Nadalje, higijena ruku je i dalje neizostavan korak u prevenciji s naglaskom na osoblje koje dolazi u najuži kontakt s hospitaliziranim i institucionaliziranim bolesnicima, ali i na osobe koje sudjeluju u pripremi i distribuciji hrane.

## ZAKLJUČCI

*P. mirabilis* je sve značajniji uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe. Ovim istraživanjem dokazali smo perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima ove bakterijske vrste u jednom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu i izvanbolničkoj populaciji. Kao i u nekim drugim istraživanjima uočen je trend skretanja beta-laktamaza od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima. Shodno tome, pravilna i brza laboratorijska identifikacija tipa cefalosporinaze postaje sve važniji preduvjet za odabir adekvatne terapije. Općenito vrijedi stav da se za infekcije koje uzrokuju ESBL-pozitivni sojevi mogu preporučiti samo karbapenemi ili piperacilin/tazobaktam, dok za AmpC-pozitivne sojeve u obzir dolazi i primjena cefepima koji ne podliježe hidrolizi AmpC beta-laktamazama. Potrebno je nastaviti s ovim tipom istraživanja kako bi se metodama molekularne epidemiologije utvrdilo širenje multirezistentnih sojeva bakterijske vrste *P. mirabilis* između bolnica, staračkih domova i okoliša.

## L I T E R A T U R A

1. Foris LA, Snowden J. *Proteus mirabilis* Infections. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017.
2. Phillipon A, Arlet G, Lagrange H. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 17-29.
3. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
4. Girlich D, Bonnin RA, Bogaerts P i sur. Chromosomal Amplification of the *bla*<sub>OXA-58</sub> Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: e01697-16.
5. Bedenić B.  $\beta$ -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji I. dio. Lijec Vjesn 2004; 126: 314-24.
6. Bedenić B.  $\beta$ -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji II. dio. Lijec Vjesn 2005; 127: 12-21.
7. Bedenić B, Sardelić S, Ladavac M. Multirezistentne bakterije. Acta Med Croatica 2015; 69: 211-6.
8. Jacoby GA, Munoz Price LS. The new  $\beta$ -lactamases. N Eng J Med 2005; 352: 380-91.
9. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1-14.
10. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 1: 33-41.

11. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. J Clin Microbiol 2009; 22: 161-82.
12. Wang JT, Chen PC, Chang SC i sur. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. BMC Infect Dis 2014; 14: 486.
13. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A i sur. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2735-42.
14. Literacka E, Empel J, Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC type cephalosporinase including two novel enzymes, CMY-14 and CMY-15 in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4136-43.
15. Cherif T, Saidani M, Decre D, Ben-Boubaker I, Arlet G. Cooccurrence of multiple AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in Tunisia. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 44-51.
16. Schneider I, Markovska R, Marteva-Proeska Y, Miltov I, Bauernfeind A. Detection of CMY-99, a novel AmpC beta-lactamase and VIM-1 in *Proteus mirabilis* isolates in Bulgaria. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 620-1.
17. Migliavacca R, Migliavacca A, Nucleo E i sur. Molecular epidemiology of ESBL producing *Proteus mirabilis* isolates from a long-term care and rehabilitation facility in Italy. New Microbiologica 2007; 30: 362-6.
18. Datta P, Gupta V, Arora S, Garg S, Chander J. Epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase production in *Proteus mirabilis*. Jpn J Infect Dis 2014; 67: 44-6.
19. Palzkill T, Thomson KS, Sanders CC, Moland ES, Huang W, Milligan TW. New variant of TEM-10 beta-lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1199-200.
20. Pagani L, Migliavacca R, Pallechi L. Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 1549-52.
21. Biendo M, Thomas D, Laurans G i sur. Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French university hospital. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 395-401.
22. Tian GB, Jiang YQ, Huang YM i sur. Characterization of CTX-M-140, a Variant of CTX-M-14 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase with Decreased Cephalosporin Hydrolytic Activity, from Cephalosporin-Resistant *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 6121-6.
23. Chaubey M, Shenoy S. Occurrence of TEM, SHV and CTX-M  $\beta$  lactamases in clinical isolates of *Proteus* species in a tertiary care center. Infect Disord Drug Targets. 2017; doi: 10.2174/1871526517666170425125217. [Epub ahead of print]
24. Sardelić S, Bedenić B, Šijak D, Colinson C, Kalenić S. Emergence of *Proteus mirabilis* isolates producing TEM-52  $\beta$ -lactamase in Croatia. Chemotherapy 2010; 56: 208-13.
25. Tonkić M, Mohar B, Sisko-Kraljević K i sur. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis* isolates in southern Croatia. J Med Microbiol 2010; 59: 1185-90.
26. Bedenić B, Firis N, Elvedi-Gašparović V i sur. Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a long-term care facility in Croatia. Wien Klin Wochenschr 2016; 128: 404-13.
27. Uzunović S, Ibrahimagić A, Hodžić D, Bedenić B. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of AmpC-and/or extended-spectrum (ESBL)  $\beta$ -lactamase producing *Proteus* spp. clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. Med Glas (Zenica) 2016; 13: 103-12.
28. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR i sur. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother 2006; 58: 211-5.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
30. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i sur. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268-81.
31. Jarlier V, Nicolas MH, 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: 867-78.
32. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4163-7.
33. Elwell S, Falkow LP. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. U: Lorian V, ur. Antibiotics in Laboratory Medicine. 2. izd. Baltimore MD: Williams and Wilkins, 1986, 683-721.
34. Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. 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: 398-402.
35. Arlet G, Bami G, Decre D i sur. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. FEMS Microbiol Lett 1995; 134: 203-8.
36. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME i sur. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 735-43.
37. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2153-62.
38. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 154-5.

39. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219-28.
40. Bedenić B, Matanović K, Mekić S, Varda-Brkić D, Šeol-Martinac B. Coproduction of CTX-M-15 and CMY-2 in animal *Escherichia coli* isolate from Croatia. 24<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain; 2014 Book of Abstracts, R060. Dostupno na: ESCMID Online Lecture Library (<https://www.escmid.org/>).
41. Rubić Ž, Šoprek S, Jelić M i sur. The first detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from University Hospital Split, Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain; 2014 Book of Abstracts, P 1027. Dostupno na: ESCMID Online Lecture Library (<https://www.escmid.org/>).
42. Literacka E, Bedenić B, Baraniak A i sur. *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (*bla*<sub>CTX-M-3a</sub>) and widely spread (*bla*<sub>CTX-M-3a</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1630-5.
43. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I i sur. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007; 19: 97-100.
44. Bedenić B, Vraneš J, Bošnjak Z i sur. Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in the community. *Med Glasn* 2010; 7: 32-9.
45. Zujic-Atalić V, Bedenić B, Kocsis E i sur. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia – the results of the multicenter study. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O894-903.
46. Petrosillo N, Vranić-Ladavac M, Feudi C i sur. Spread of *Enterobacter cloacae* carrying *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> and plasmid-mediated quinolone resistance genes in a surgical intensive care unit in Croatia. *J Glob Antimicrob Res* 2016; 4: 44-8.
47. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J i sur. Molecular characterization of class B carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class D carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genet Evol* 2016; 43: 74-82.
48. Bedenić B, Goić-Barišić I, Budimir A i sur. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of selected gram-negative bacilli from two Croatian hospitals: MYSTIC study results. *J Chemother* 2010; 22: 147-52.
49. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998; 39: 520-5.
50. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamairellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 221-4.
51. Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM i sur. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 328-33.
52. Mac Aogáin M, Rogers TR, Crowley B. Identification of emergent *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. *New Microbes New Infect* 2015; 9: 58-62.
53. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 294-9.
54. Tamma PD, Rodriguez-Bano J. The use of Noncarbapenemctamases beta-Lactams for the treatment of extended-spectrum beta-lactamase infections. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 972-80.
55. Leclercq R, Cantón R, Brown DF i sur. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 141-60.
56. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA i sur. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 294-9.

## SUMMARY

### CEPHALOSPORINASES IN *PROTEUS MIRABILIS* ISOLATES FROM LONG-TERM CARE FACILITIES AND THE COMMUNITY

T. MEŠTROVIĆ<sup>1</sup>, A. LUKIĆ-GRLIĆ<sup>2,3</sup>, M. BOGDAN<sup>4</sup>, D. BANDIĆ-PAVLOVIĆ<sup>5</sup>, G. CAVRIĆ<sup>6</sup>,  
D. DRENJANČEVIĆ<sup>7,8</sup>, K. B. SRETER<sup>9</sup>, A. BENČIĆ<sup>2</sup>, S. SARDELIĆ<sup>10</sup> and B. BEDENIĆ<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Dr. Zora Profozić Polyclinic, Clinical Microbiology and Parasitology Unit, Zagreb, Croatia, <sup>2</sup>University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia, <sup>3</sup>Department of Laboratory Diagnosis, Zagreb Children's Hospital, Zagreb, Croatia, <sup>4</sup>Microbiology Service, Institute of Public Health of the Osijek-Baranja County, Osijek, Croatia, <sup>5</sup>Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia, <sup>6</sup>Internal Medicine Department, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia, <sup>7</sup>Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine, Osijek, Croatia, <sup>8</sup>Osijek University Hospital Centre, Osijek, Croatia, <sup>9</sup>Sestre milosrdnice University Hospital Centre, Zagreb, Croatia, <sup>10</sup>Split University Hospital Centre, Split, Croatia

*Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) is increasingly recognized as a causative agent of hospital and community acquired infections, including those in long-term care facilities (LTCFs). Previous studies on *P. mirabilis* from Croatia showed the predominance of TEM-52 extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and the emergence of plasmid AmpC beta-lactamases. The aim of the present study was to investigate the evolution and dynamics of cephalosporinases in *P. mirabilis* from LTCFs and to compare the isolates found in the LTCFs with those from a community setting. A total of 41 isolates of *P. mirabilis* resistant to third-generation cephalosporins were collected from two nursing homes and from outpatients from March 2015 until September 2017. Antibiotic susceptibility testing was performed by the broth microdilution method. ESBLs and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases were detected by phenotypic inhibitor-based tests and by polymerase chain reaction (PCR). Plasmids were characterized by utilizing conjugation and transformation experiments, as well as PCR-based replicon typing. All isolates exhibited high level of resistance to amoxicillin alone and in combination with clavulanic acid, as well as to first-, second- and third-generation cephalosporins. Three isolates tested positive in inhibitor-based test with clavulanic acid, and 38 in Hodge test and combined disk test with phenylboronic acid, indicating the production of ESBLs and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases, respectively. Two ESBL-positive organisms yielded amplicons with primers specific for CTX-M beta-lactamase of group 1 and one for TEM. All AmpC-positive organisms were identified by PCR as CMY. CTX-M positive strains harbored IncK plasmid, whereas AmpC-positive strains were negative for known plasmid types. This study demonstrated persistence of CMY beta-lactamases in one LTCF, but also dissemination of the aforementioned resistance determinants to another nursing home and to the community setting. Akin to other studies, there was a trend of cephalosporinase dynamic switch from TEM variants to CTX-M and CMY. Therefore, accurate and swift laboratory identification of cephalosporinase type is becoming pivotal for appropriate choice of treatment.

**Key words:** Cephalosporinase – genetics; Cephalosporins – pharmacology; *Proteus mirabilis* – genetics; Drug resistance, bacterial – drug effects, genetics; Beta-lactamases – genetics, metabolism; Plasmids – analysis, genetics; Microbial sensitivity tests; Croatia – epidemiology