

## Karakterizacija ESBL-producirajućih sojeva bakterija *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* izoliranih iz mokraće izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije

Tatjana Marijan<sup>1</sup>, Vanda Plečko<sup>2</sup>, Jasmina Vraneš<sup>1</sup>, Ana Mlinarić Džepina<sup>1</sup>, Branka Bedenić<sup>2</sup>, Smilja Kalenić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar"; <sup>2</sup>Klinički bolnički centar Zagreb; Zagreb, Hrvatska

### SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Utvrditi prevalenciju izvanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *E. coli* i *K. pneumoniae*, izoliranih iz urina izvanbolničkih pacijenata u trogodišnjem razdoblju, utvrditi njihovu distribuciju prema spolu i dobi, odrediti osjetljivost na ostale skupine antibiotika, ispitati prenosivost ESBL rezistencije i kotransfer rezistencije, te molekularno tipizirati izolirane beta-laktamaze.

**Materijal i metode:** Antibiotiska osjetljivost ispitana je metodama disk difuzije i bujonske mikrodilucije. ESBL-produkcija utvrđena je metodom dvostrukog diska, a potvrđena bujonskom mikrodilucijom. Prijenos rezistencije ispitan je metodom konjugacije, a karakterizacija izoliranih beta-laktamaza lančanom reakcijom polimeraze.

**Rezultati:** Prevalencija ESBL-pozitivne *E. coli* iznosila je 1,5%, a *K. pneumoniae* 4,1%, dok je svaka vrsta pokazivala drugačiju distribuciju s obzirom na dob i spol pacijenata. ESBL-producirajući sojevi *K. pneumoniae* pokazivali su visoku rezistenciju na aminoglikozide, kotrimoksazol, nitrofurantoin i kinolone, dok su ESBL-producirajući sojevi *E. coli*, s izuzetkom visoke rezistencije na aminoglikozide, pokazivali niske stope rezistencije na ostale antibiotike. Metodom konjugacije ostvaren je prijenos ESBL gena u 25% sojeva *E. coli*, te u 76,2% sojeva *K. pneumoniae*. Izolati *K. pneumoniae* ostvarili su, u odnosu na izolate *E. coli*, veću stopu kotransfera rezistencije na aminoglikozide i kotrimoksazol. Ispitivani sojevi posjedovali su  $\beta$ -laktamaze TEM, SHV i CTX-M porodica.

**Zaključci:** U ispitivanoj izvanbolničkoj populaciji utvrđeno je prisustvo multiplerezistentnih ESBL-producirajućih urinarnih izolata *E. coli* i *K. pneumoniae*. ESBL-producirajući izolati *K. pneumoniae* pokazivali su, u odnosu na ESBL-producirajuće izolate *E. coli*, veću stopu rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike, vjerojatno uzrokovanu kotransferom gena smještenima na istom plazmidu kao i geni za ESBL. Potrebno je daljnje aktivno praćenje učestalosti ovakvih izolata, te njihovog eventualnog širenja u izvanbolničkoj populaciji zagrebačke regije.

**Ključne riječi:** infekcije mokraćnog sustava, konjugacija, kotransfer rezistencije.

### Corresponding author:

Tatjana Marijan,  
Služba za mikrobiologiju,  
Zavod za javno zdravstvo  
"Dr. Andrija Štampar",  
Mirogojska 16, 10 000 Zagreb, Hrvatska  
Phone: +385 1 469 6303,  
fax: +385 1 467 8006  
E-mail: tatjana.marijan@stampar.hr

### Originalna prijava:

13. oktobar 2009.;

### Korigirana verzija:

14. decembar 2009.;

### Prihvaćeno:

18. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):46-53

## UVOD

Bakterije koje produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), osim u hospitaliziranih pacijenata, sve se češće izoliraju i u izvanbolničkoj populaciji (1-3). Prvi opisi bolničkih ESBL-producirajućih izolata u Hrvatskoj potječu iz 1994. godine (4), a odnosili su se, kao i druga istraživanja koja su uslijedila, na bolničke izolate *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (5, 6). Izvješće Odbora za praćenje rezistencije na antibiotike u Republici Hrvatskoj, koji uključuje bolničke i izvanbolničke ESBL-producirajuće sojeve, pokazuje blagi pad ESBL-producirajućih sojeva *E. coli* (6% 1997.; 3% 2000.; 2% 2003.) (7, 8). Nešto drugačiju tendenciju kretanja, u istom razdoblju, pokazuju izolati *K. pneumoniae* rezistentni na cefalosporine treće generacije (21% 1997.; 24% 2000.; 18% 2003.) (7, 8). Navedeni podaci ne razlučuju između bolničkih i izvanbolničkih ESBL-producirajućih izolata.

Ciljevi istraživanja bili su utvrditi prevalenciju ESBL-producirajućih izolata, utvrditi njihovu distribuciju prema spolu i dobi pacijenata, odrediti osjetljivost na ostale skupine antibiotika, ispitati prenosivost ESBL rezistencije i kotransfer rezistencije na ostale antibiotike, te molekularno tipizirati izolirane beta-laktamaze. Svrha ovog istraživanja bila je okarakterizirati izvanbolničke ESBL-producirajuće izolate *E. coli* i *K. pneumoniae*, kako bi se dobio uvid o njihovoj zastupljenosti i osnovnim karakteristikama, te, na taj način, postavila osnova za daljnje epidemiološko praćenje.

## MATERIJAL I METODE

U laboratoriju za mokraćno-spolne infekcije Zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" u Zagrebu, u razdoblju od 01. 01. 2001. do 31. 12. 2003. godine, pregledani su svi uzorci urina izvanbolničkih pacijenata, u okviru rutinske, klinički indicirane, bakteriološke analize. Svim izoliranim sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae*, izoliranim iz urina pacijenata sa signifikantnom bakteriurijom, napravljen je test osjetljivosti na antibiotike i ispitana produkcija beta-laktamaza proširenog spektra, te analizirana njihova distribucija s obzirom na spol i dob pacijenata. Svim primoizolatima ESBL-producirajuće *E. coli*, izoliranim u razdoblju od 01. 06. 2003. do 31. 12. 2003. godine, te svim primoizolatima *K. pneumoniae*, izoliranim tijekom cijele 2003., ispitana je antibiotska osjetljivost, prijenos ESBL-gena i kotransfer rezisten-

cije, te provedena molekularna karakterizacija izoliranih beta-laktamaza.

Svim primoizolatima *E. coli* i *K. pneumoniae*, prema važećim standardima CLSI-a, metodom bujonske mikrodilucije određena je antibiotska osjetljivost na beta-laktamske antibiotike, aminoglikozide i kinolone (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), a osjetljivost na trimetoprim-sulfametoksazol (1,25/23,75 µg), nitrofurantoin (300 µg), tetraciklin (30 µg) i kloramfenikol (30 µg) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquett, Francuska) disk difuzijskom metodom (9). Produkcija beta-laktamaza proširenog spektra utvrđena je metodom dvostrukog diska, a potvrđena metodom bujonske mikrodilucije prema standardu CLSI-a (9, 10).

Prijenos rezistencije ispitan je metodom konjugacije u moždano-srčanom infuzijskom (BHI) bujonu (11, 12). Kao recipijent korišten je soj *E. coli* A 15 R<sup>-</sup>. Nakon konjugacije, bakterijske suspenzije inokulirane su na slijedeće selektivne podloge: MacConkey agar (Oxoid LTD, Hampshire, Engleska) s 2 mg/L ceftazidima (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), MacConkey agar s 256 mg/L rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i MacConkey agar s 2 mg/L ceftazidima i 256 mg/L rifampicina. Osim prijenosa rezistencije na beta-laktamske antibiotike, ispitan je i prijenos rezistencije na aminoglikozide, kotrimoksazol, ciprofloksacin, nitrofurantoin, tetraciklin i kloramfenikol.

Lančana reakcija polimeraze izvedena je na izolatima pacijenata (sojevi donori), te na njihovim transkonjugantima (12). Ukratko, izolacija nukleinske kiseline sojeva izvedena je kuhanjem sojeva 10 min. na 95°C, u sterilnoj destiliranoj vodi. 5 µl tako pripremljenog uzorka dodano je u 45 µl reakcijske smjese (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, SAD) koja je sadržavala: 18 µl sterilne destilirane vode, 25 µl PCR master mixa (25 U Taq DNA polimeraze u 20 mM Tris-HCL, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, Brij 35, 0,01%(v/v), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP-svaki 0,4 mM)) i 1 µl svakog primera. Za detekciju TEM β-laktamaza korišteni su primeri: OT-3 (TIB MOLBIOL) 5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG i OT-4 (TIB MOLBIOL) 5'- CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG. Za detekciju SHV β-laktamaza korišteni su primeri: SHV-F (TIB MOLBIOL) 5'- GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC i SHV-R (TIB MOLBIOL) 5'- TC-TTTCCGATGCCCGCCGAGTCA. Za detekciju CTX-M β-laktamaza korišteni su primeri: MA-1

**Tablica 1. Distribucija ESBL-pozitivnih izolata *E. coli* i *K. pneumoniae* s obzirom na dob i spol pacijenata**

| Dob (godine) | <i>E. coli</i> |                 | <i>K. pneumoniae</i> |                 |
|--------------|----------------|-----------------|----------------------|-----------------|
|              | Muški spol (N) | Ženski spol (N) | Muški spol (N)       | Ženski spol (N) |
| 0-1          | 45             | 30              | 3                    | 4               |
| 2-10         | 15             | 24              | 0                    | 1               |
| 11-20        | 2              | 6               | 0                    | 1               |
| 21-30        | 3              | 31              | 1                    | 8               |
| 31-40        | 2              | 28              | 0                    | 3               |
| 41-50        | 2              | 26              | 4                    | 4               |
| 51-60        | 8              | 27              | 3                    | 4               |
| 61-70        | 14             | 20              | 3                    | 3               |
| 71-80        | 7              | 25              | 8                    | 5               |
| ≥ 81         | 2              | 6               | 2                    | 3               |
| Nepoznata    | 2              | 11              | 0                    | 3               |
| Ukupno       | 102            | 234             | 24                   | 39              |

(TIB MOLBIOL) 5'-SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA i MA-2 (TIB MOLBIOL) 5'-CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG (S=G/C, Y=C/T, R=A/G). Reakcije su izvedene na aparatu GeneAmp PCR System 9600, Version 2.00 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nakon amplifikacije, uzorci su podvrgnuti elektroforezi u 1% agarozu-gelu, uz 1 x TBE pufer. DNA vrpce su vizualizirane na

UV transiluminatoru nakon bojenja etidijum bromidom.

Statistička obrada rezultata izvedena je  $\chi$ -kvadratom i Fisherovim egzaktnim testom. Statistički značajnom smatrana je p-vrijednost <0,01.

## REZULTATI

Od ukupno 21 918 izolata *E. coli* i 1 553 izolata *K. pneumoniae*, produkcija beta-laktamaza proširenog spektra značajno je češće utvrđena u sojeva *K. pneumoniae* u odnosu na *E. coli* ( $p < 0,01$ ), 63 (4,1%), odnosno 336 (1,5%). Izolati su pokazivali različitu distribuciju s obzirom na dob i spol pacijenata (Tablica 1).

Najveću osjetljivost, među ispitivanim aminoglikozidima, izolati *E. coli* pokazivali su na netilmicin (50,0%), dok je osjetljivost na gentamicin i amikacin bila podjednaka (20,8%; 22,9%). Suprotno tome, izolati *K. pneumoniae* najbolju osjetljivost pokazivali su na amikacin (52,4%),

**Tablica 2. Osjetljivost izolata *E. coli* na različite antibiotike, utvrđena metodom bujonske mikrodilucije**

| Oznaka soja | Minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) na različite antibiotike* |      |      |      |      |      |     |       |     |      |      |      |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|-----|-------|-----|------|------|------|
|             | AMX                                                                   | CN   | CXM  | CAZ  | CTX  | FEP  | FOX | IPM   | AMC | TZP  | GM   | NET  |
| 1           | >128                                                                  | 64   | 32   | 32   | 8    | 2    | 4   | 1     | 4   | 2    | 32   | 16   |
| 2           | >128                                                                  | 64   | 32   | 128  | 1    | 4    | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 64   | 8    |
| 3           | >128                                                                  | 64   | 32   | 32   | 8    | 1    | 4   | 0,125 | 4   | 2    | 32   | 8    |
| 4           | >128                                                                  | 128  | 16   | 128  | 8    | 1    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 8    |
| 5           | >128                                                                  | >128 | 32   | 32   | 8    | 1    | 2   | 0,125 | 4   | 1    | 16   | 8    |
| 6           | >128                                                                  | >128 | 16   | 32   | 8    | 1    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 16   |
| 7           | >128                                                                  | 64   | 16   | 64   | 16   | 2    | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 0,5  | 0,25 |
| 8           | >128                                                                  | 64   | 16   | 32   | 8    | 2    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 16   |
| 9           | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | 64   | 16   | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 16   | 8    |
| 10          | >128                                                                  | 64   | 16   | 64   | 16   | 4    | 4   | 0,25  | 4   | 2    | 16   | 8    |
| 11          | >128                                                                  | >128 | 128  | >128 | 64   | 32   | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 64   | 64   |
| 12          | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 4   | 0,125 | 8   | >256 | 32   | 64   |
| 13          | >128                                                                  | 64   | 32   | 128  | 16   | 4    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 64   | 64   |
| 14          | >128                                                                  | 64   | 32   | 32   | 64   | 8    | 2   | 0,125 | 16  | 64   | 32   | 64   |
| 15          | >128                                                                  | 64   | 32   | >128 | 16   | 2    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 16   |
| 16          | >128                                                                  | >128 | 64   | 128  | 16   | 8    | 4   | 0,25  | 4   | 2    | 4    | 0,5  |
| 17          | >128                                                                  | 128  | 128  | >128 | 32   | 8    | 4   | 0,125 | 4   | 2    | 0,5  | 0,5  |
| 18          | >128                                                                  | 64   | 16   | 128  | 32   | 2    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 8    |
| 19          | >128                                                                  | >128 | >128 | 2    | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 16  | 2    | 1    | 0,5  |
| 20          | >128                                                                  | 64   | 32   | 64   | 16   | 2    | 4   | 0,25  | 4   | 1    | 0,5  | 0,25 |
| 21          | >128                                                                  | 64   | 64   | 128  | 32   | 1    | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 64   | 16   |
| 22          | >128                                                                  | >128 | >128 | 2    | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 8   | 2    | 1    | 0,5  |
| 23          | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | >128 | 64   | 8   | 0,125 | 16  | 64   | 64   | 16   |
| 24          | >128                                                                  | 128  | 128  | 128  | 128  | 1    | 4   | 0,06  | 4   | 2    | 64   | 16   |
| 25          | >128                                                                  | 128  | 64   | 16   | 16   | 2    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 64   | 8    |
| 26          | >128                                                                  | 64   | 64   | 32   | 32   | 8    | 4   | 0,25  | 16  | 64   | 0,5  | 2    |
| 27          | >128                                                                  | >128 | 128  | 64   | 64   | 16   | 4   | 0,125 | 4   | 2    | 64   | 16   |
| 28          | >128                                                                  | 128  | 64   | 128  | 64   | 8    | 4   | 0,25  | 4   | 1    | 0,5  | 2    |
| 29          | >128                                                                  | 64   | 64   | 64   | 64   | 4    | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 128  | 8    |
| 30          | >128                                                                  | >128 | 64   | >128 | 128  | 8    | 8   | 0,125 | 4   | 4    | 64   | 16   |
| 31          | >128                                                                  | 128  | 128  | 64   | 128  | 128  | 4   | 0,25  | 16  | 256  | 128  | 32   |
| 32          | >128                                                                  | 64   | 16   | 64   | 32   | 2    | 8   | 0,25  | 4   | 2    | 32   | 8    |
| 33          | >128                                                                  | >128 | 128  | >128 | 128  | 8    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | >128 | 16   |
| 34          | >128                                                                  | >128 | >128 | 2    | >128 | >128 | 8   | 0,5   | 4   | 1    | 2    | 4    |
| 35          | >128                                                                  | 128  | 8    | >128 | 64   | 1    | 4   | 0,125 | 4   | 2    | 128  | 8    |
| 36          | >128                                                                  | 16   | 16   | 16   | 64   | 1    | 4   | 0,125 | 4   | 1    | 64   | 16   |
| 37          | >128                                                                  | >128 | 64   | >128 | >128 | 16   | 4   | 0,125 | 4   | 2    | >128 | 8    |
| 38          | >128                                                                  | 64   | 32   | 128  | 16   | 2    | 8   | 0,125 | 4   | 2    | 32   | 8    |
| 39          | >128                                                                  | 32   | 16   | 8    | 4    | 1    | 2   | 0,125 | 8   | 16   | 32   | 32   |
| 40          | >128                                                                  | 16   | 8    | 16   | 16   | 1    | 2   | 0,25  | 16  | 16   | 32   | 16   |
| 41          | >128                                                                  | 32   | 64   | 128  | 32   | 2    | 2   | 0,125 | 4   | 1    | 32   | 16   |
| 42          | >128                                                                  | 32   | 16   | 32   | 32   | 1    | 2   | 0,125 | 8   | 2    | 32   | 16   |
| 43          | >128                                                                  | 128  | 64   | >128 | 32   | 4    | 4   | 0,25  | 2   | 2    | 32   | 16   |
| 44          | >128                                                                  | 32   | 8    | 32   | 8    | 2    | 4   | 0,125 | 2   | 2    | 32   | 8    |
| 45          | >128                                                                  | >128 | 128  | >128 | 32   | 8    | 2   | 0,125 | 4   | 2    | 0,5  | 0,25 |
| 46          | >128                                                                  | 32   | 64   | 128  | 16   | 0,5  | 4   | 0,125 | 4   | 2    | 32   | 16   |
| 47          | >128                                                                  | 64   | 32   | 64   | 16   | 2    | 4   | 0,25  | 4   | 2    | 16   | 32   |
| 48          | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 8   | 0,5   | 16  | 64   | 64   | 32   |

\*AMX, amoksicilin; CN, cefaleksin; CXM, cefuroksim; CAZ, ceftazidim; CTX, cefotaksim; FEP, cefepim; FOX, cefoksitin; IPM, imipenem; AMC, amoksicilin/klavulanat; TZP, piperacilin/tazobaktam; GM, gentamicin; NET, netilmicin; AN, amikacin; CIP, ciprofloksacin.

Tablica 3. Osjetljivost izolata *K. pneumoniae* na različite antibiotike, utvrđena metodom bujonske mikrodilucije

| Oznaka | Minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) na različite antibiotike* |      |      |      |      |      |     |       |     |     |     |      |     |       |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|-----|-------|-----|-----|-----|------|-----|-------|
| soja   | AMX                                                                   | CN   | CXM  | CAZ  | CTX  | FEP  | FOX | IPM   | AMC | TZP | GM  | NET  | AN  | CIP   |
| 49     | >128                                                                  | 128  | 32   | >128 | 32   | 8    | 8   | 0,25  | 8   | 16  | 0,5 | 0,5  | 1   | 0,125 |
| 50     | >128                                                                  | >128 | 128  | >128 | 64   | 8    | 8   | 0,25  | 8   | 16  | 32  | 32   | 64  | 0,03  |
| 51     | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 16  | 16  | 64  | 16   | 2   | 64    |
| 52     | >128                                                                  | 128  | 32   | 128  | 32   | 2    | 4   | 0,5   | 4   | 2   | 1   | 128  | 64  | 0,125 |
| 53     | >128                                                                  | >128 | >128 | 128  | >128 | >128 | 8   | 0,5   | 16  | 16  | 64  | 32   | 8   | 64    |
| 54     | >128                                                                  | >128 | >128 | 128  | 16   | >128 | 8   | 0,5   | 2   | 2   | 2   | 64   | 64  | 0,25  |
| 55     | >128                                                                  | >128 | 64   | >128 | 64   | 16   | 8   | 0,25  | 8   | 64  | 4   | 32   | 64  | 1     |
| 56     | >128                                                                  | 128  | 32   | 64   | 8    | 2    | 8   | 0,5   | 8   | 4   | 32  | 64   | 64  | 0,5   |
| 57     | >128                                                                  | >128 | >128 | 128  | >128 | >128 | 4   | 0,5   | 16  | 16  | 128 | 64   | 32  | >128  |
| 58     | >128                                                                  | 128  | 128  | >128 | 64   | 8    | 8   | 0,25  | 4   | 16  | 0,5 | 0,5  | 1   | 0,125 |
| 59     | >128                                                                  | >128 | 64   | >128 | >128 | 16   | 4   | 1     | 4   | 2   | 2   | 128  | 64  | 2     |
| 60     | >128                                                                  | 64   | 32   | >128 | 32   | 2    | 8   | 0,5   | 4   | 2   | 0,5 | 0,25 | 1   | 0,03  |
| 61     | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 8   | 0,5   | 16  | 16  | 128 | 32   | 8   | 128   |
| 62     | >128                                                                  | 128  | 128  | 64   | 4    | 32   | 8   | 0,5   | 1   | 4   | 0,5 | 1    | 2   | 0,03  |
| 63     | >128                                                                  | >128 | 64   | 128  | 128  | 4    | 8   | 0,125 | 4   | 16  | 0,5 | 1    | 0,5 | 4     |
| 64     | >128                                                                  | >128 | >128 | >128 | 128  | 8    | 4   | 0,5   | 4   | 16  | 32  | 8    | 32  | 2     |
| 65     | >128                                                                  | >128 | >128 | 128  | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 16  | 16  | 64  | 32   | 4   | 128   |
| 66     | >128                                                                  | >128 | 64   | >128 | 64   | 32   | 8   | 0,5   | 4   | 16  | 32  | 8    | 32  | 16    |
| 67     | >128                                                                  | >128 | >128 | 64   | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 16  | 16  | 128 | 64   | 8   | 64    |
| 68     | >128                                                                  | >128 | 128  | >128 | 64   | 16   | 8   | 0,25  | 8   | 32  | 16  | 32   | 64  | 64    |
| 69     | >128                                                                  | >128 | >128 | 64   | >128 | >128 | 8   | 0,25  | 16  | 16  | 128 | 64   | 4   | 128   |

\*AMX, amoksicilin; CN, cefaleksin; CXM, cefuroksim; CAZ, ceftazidim; CTX, cefotaksim; FEP, cefepim; FOX, cefoksitin; IPM, imipenem; AMC, amoksicilin/klavulanat; TZP, piperacilin/tazobaktam; GM, gentamicin; NET, netilmicin; AN, amikacin; CIP, ciprofloksacin.

a najslabiju na netilmicin (33,3%). Sojevi *E. coli* značajno su u većem postotku bili osjetljivi na fluorokinolone (93,8%) u odnosu na sojeve *K. pneumoniae* (42,9%). Primijećena je i visoka stopa rezistencije na tetraciklin (*E. coli* 50,0%, *K. pneumoniae* 47,6%), te vrlo niska stopa rezistencije na kombinaciju beta-laktama s inhibitorom beta-laktamaza u obje ispitivane vrste (Tablice 2 i 3). Čak je 71,4% sojeva *K. pneumoniae* bilo rezistentno na kotrimoksazol. Osjetljivost na kotrimoksazol ispitana je u svih 336 sojeva ESBL-producirajućih *E. coli*, a rezistentno je bilo 7,1% sojeva. Od toga niti jedan soj *E. coli*, rezistentan na kotrimoksazol, nije utvrđen kod djece do godinu dana starosti, dok je u

starijih od godinu dana, rezistencija na kotrimoksazol iznosila 9,3% ( $p < 0,01$ ).

Beta-laktamaze proširenog spektra prenesene su metodom konjugacije u ukupno 28 (40,6%) od ispitivanih 69 sojeva. Prijenos beta-laktamske rezistencije ostvaren je u 12 (25%) od 48 sojeva *E. coli*, te, u čak 16 (76,2%) od 21 soja *K. pneumoniae*. Stopa kotransfera aminoglikozidne rezistencije bila je u izolata *E. coli* izrazito niska (18,2%), a u izolata *K. pneumoniae* vrlo visoka (83,3%). U *K. pneumoniae* kotransfer rezistencije na kotrimoksazol ostvaren je u 18,2%, na tetraciklin u 28,6%, na kloramfenikol u 25% sojeva, a do prijenosa nitrofurantoinске rezistencije nije došlo. U *E. coli*

Tablica 4. Pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M u izolatima *E. coli* i njihovim transkonjugantima (T)

| Oznaka soja | TEM | SHV | CTX-M | Oznaka soja | TEM | SHV | CTX-M | Oznaka soja | TEM | SHV | CTX-M |
|-------------|-----|-----|-------|-------------|-----|-----|-------|-------------|-----|-----|-------|
| 1           | +   | +   | -     | 17          | -   | +   | -     | 33          | -   | +   | -     |
| 2           | +   | +   | -     | 18          | +   | +   | -     | 34          | +   | -   | +     |
| 2T          | +   | +   | -     | 18T         | +   | +   | -     | 35          | +   | +   | -     |
| 3           | +   | +   | -     | 19          | +   | -   | +     | 35T         | +   | +   | -     |
| 4           | +   | +   | -     | 20          | -   | +   | -     | 36          | -   | +   | -     |
| 4T          | +   | +   | -     | 20T         | -   | +   | -     | 37          | +   | +   | -     |
| 5           | +   | +   | -     | 21          | +   | +   | -     | 37T         | +   | +   | -     |
| 6           | +   | +   | -     | 21T         | +   | +   | -     | 38          | +   | +   | -     |
| 6T          | +   | +   | -     | 22          | +   | -   | +     | 39          | +   | +   | -     |
| 7           | +   | +   | -     | 23          | +   | +   | -     | 40          | +   | +   | -     |
| 8           | +   | +   | -     | 24          | -   | +   | -     | 41          | -   | +   | -     |
| 9           | -   | +   | -     | 24T         | -   | +   | -     | 42          | +   | +   | -     |
| 10          | -   | +   | -     | 25          | -   | +   | -     | 43          | -   | +   | -     |
| 11          | -   | +   | -     | 26          | +   | +   | -     | 44          | -   | +   | -     |
| 12          | +   | +   | -     | 27          | +   | +   | -     | 45          | -   | +   | -     |
| 12T         | +   | +   | -     | 28          | -   | +   | -     | 46          | -   | +   | -     |
| 13          | +   | +   | -     | 29          | +   | +   | -     | 47          | -   | +   | -     |
| 13T         | +   | +   | -     | 29T         | +   | +   | -     | 48          | -   | -   | +     |
| 14          | +   | +   | -     | 30          | +   | +   | -     |             |     |     |       |
| 15          | +   | +   | -     | 31          | +   | +   | -     |             |     |     |       |
| 16          | +   | +   | -     | 32          | -   | +   | -     |             |     |     |       |

kotransfer rezistencije na tetraciklin ostvaren je u 40% sojeva, a kotransfer rezistencije na kotrimoksazol i nitrofurantoin nije zamijećen. U dva soja *K. pneumoniae* postavljena je sumnja na prijenos kinolonske rezistencije konjugacijom. MIK na ciprofloksacin u jednog je soja iznosio 4 µg/ml, a u njegovog transkonjuganta 2 µg/ml, dok je MIK drugog soja iznosio 0,5 µg/ml, a njegovog transkonjuganta 1 µg/ml.

Od 48 ispitivanih sojeva *E. coli*  $bla_{TEM}$  gen je utvrđen u 30 (62,6%),  $bla_{SHV}$  u 44 (91,7%), a  $bla_{CTX-M}$  u četiri (8,3%) soja. U 26 (54,2%) sojeva utvrđeno je prisustvo i  $bla_{TEM}$  i  $bla_{SHV}$  gena. Samo  $bla_{SHV}$  imalo je 17 (35,4%) sojeva *E. coli*, dok niti jedan soj nije imao samo  $bla_{TEM}$  gen. Od 21 ispitivanog soja *K. pneumoniae*, svi su sojevi nosili  $bla_{SHV}$  gen. U svih sojeva koji su konjugacijom u recipijent prenijeli ESBL-pozitivan fenotip, prenesen je i  $bla_{SHV}$  gen. Deset (47,6%) sojeva posjedovalo je  $bla_{TEM}$  gen, a osam (38,1%) sojeva  $bla_{CTX-M}$  gen (Tablice 4 i 5).

## DISKUSIJA

I u ovom istraživanju ESBL-producirajući izolati češće su bili zastupljeni kod žena. Od svih ESBL-producirajućih *E. coli*, izoliranih u pacijenata muškog spola, čak je 58,8% otpadalo na djecu do desete godine života, većinom (75%) dječaka dojenačke dobi. Kod žena nije zamijećena razlika u pojavnosti ESBL-pozitivne *E. coli* s obzirom na dob, dok je ESBL-producirajuća *K. pneumoniae* bila najzastupljenija kod žena generativne dobi. To se

može tumačiti najvećom učestalosti mokraćnih infekcija u toj dobnoj skupini. U istraživanju provedenom u Kanadi, od ukupno izoliranih 157 izolata s ESBL-produkcijom, 71% je pripadalo pacijentima s izvanbolnički stečenom infekcijom, češće su bili izolirani kod žena u svim dobnim skupinama, a najveća incidencija ESBL-pozitivnih izolata opažena je u dobnoj skupini starijih od 65 godina, dok je kod mlađih od 10 godina bila iznimno mala (13). U našoj populaciji, osim u dojenačkoj dobi, većina ESBL-producirajućih izolata (kako *E. coli*, tako i *K. pneumoniae*) izolirana je kod pacijenata starijih od 40 godina, što se pak može tumačiti činjenicom da se u toj dobi kod muškaraca, zbog komplicirajućih čimbenika, infekcije mokraćnog sustava javljaju češće. I drugi autori navode stariju životnu dob kod muških pacijenata, kao jedan od rizičnih faktora za stjecanje infekcije uzrokovane ESBL-producirajućim bakterijama (14, 15). Međutim, zabrinjava podatak da je velik udio ESBL-pozitivnih izolata izoliran kod dojenčadi. Može se pretpostaviti da se radi o produženom kliconoštvu stečenom na neonatalnim odjelima. Tome u prilog govore podaci istraživanja provedenog u Kliničkoj bolnici Split, gdje je daleko veća zastupljenost ESBL-producirajućih izolata primijećena kod pedijatrijskih pacijenata, osobito u neonatalnoj jedinici intenzivnog liječenja (6). Sve je više navoda u literaturi koji govore o epidemijama na neonatalnim odjelima, uzrokovanih ESBL-producirajućim enterobakterijama, do kojih dovodi širenje jednog ili više klonova, ili pak plazmidni prijenos *bla* gena između iste ili različitih bakterijskih vrsta (16-18).

Sojevi koji produciraju ESBL često posjeduju multiplu rezistenciju, budući da su beta-laktamaze proširenog spektra kodirane genima na plazmidima koji često nose i gene rezistencije na aminoglikozide, sulfonamide, trimetoprim i kloramfenikol (19, 20). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je prijenos gena za ESBL ostvaren u 25% sojeva *E. coli* i 76,2 % sojeva *K. pneumoniae*. Istraživanja drugih autora daju raznolike postotke uspješnosti prijenosa gena rezistencije u enterobakterija (23,5% do 87%), te opisuju čest kotransfer rezistencije na aminoglikozide, kotrimoksazol i tetracikline (21-23). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je stopa kotransfera rezistencije u značajno većem broju postignuta kod izolata *K. pneumoniae*, u odnosu na izolate *E. coli*, osobito kod prijenosa gena rezistencije za aminoglikozide i kotrimoksazol.

Tablica 5. Pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M u izolatima *K. pneumoniae* i njihovim transkonjugantima (T)

| Oznaka soja | TEM | SHV | CTX-M | Oznaka soja | TEM | SHV | CTX-M |
|-------------|-----|-----|-------|-------------|-----|-----|-------|
| 49          | -   | +   | -     | 59          | +   | +   | -     |
| 49T         | -   | +   | -     | 59T         | +   | +   | -     |
| 50          | -   | +   | +     | 60          | -   | +   | -     |
| 51          | -   | +   | +     | 60T         | -   | +   | -     |
| 51T         | -   | +   | +     | 61          | +   | +   | +     |
| 52          | +   | +   | -     | 61T         | +   | +   | +     |
| 52T         | +   | +   | -     | 62          | -   | +   | -     |
| 53          | -   | +   | +     | 63          | -   | +   | -     |
| 53T         | -   | +   | +     | 63T         | -   | +   | -     |
| 54          | +   | +   | -     | 64          | -   | +   | -     |
| 54T         | +   | +   | -     | 65          | +   | +   | +     |
| 55          | +   | +   | -     | 65T         | +   | +   | +     |
| +5+5T       | +   | +   | -     | 66          | -   | +   | -     |
| 56          | +   | +   | -     | 67          | +   | +   | +     |
| 56T         | +   | +   | -     | 68          | -   | +   | -     |
| 57          | +   | +   | +     | 68T         | -   | +   | -     |
| 57T         | +   | +   | +     | 69          | +   | +   | +     |
| 58          | -   | +   | -     | 69T         | +   | +   | +     |
| 58T         | -   | +   | -     |             |     |     |       |



Stopa rezistencije na aminoglikozide, utvrđena ovim istraživanjem, bila je značajno viša od one utvrđene istraživanjem koje je obuhvatilo različite urinarne izolate izvanbolničke populacije zagrebačkog područja (24). U tom se istraživanju rezistencija na gentamicin u ESBL-negativnih izolata *E. coli*, kretala od 3,9% do 11,1%, ali je opažena visoka stopa rezistencije na kotrimoksazol (26,4%-36,3%) (24). Rezultati ovog istraživanja pokazali su visoku stopu rezistencije na kotrimoksazol u sojeva *K. pneumoniae* (71,4%), dok je u sojeva *E. coli* ona bila začuđujuće niska (7,1%). Čak 30,2% ispitivanih sojeva *E. coli*, izolirano je kod djece mlađe od godinu dana kod kojih je primjena kotrimoksazola izuzetno rijetka. Razlog za tako nisku stopu rezistencije na kotrimoksazol, ipak se ne može tumačiti velikim udjelom sojeva izoliranih u djece, budući da se postotak rezistencije na kotrimoksazol nije značajno mijenjao ni kada su izostavljeni izolati djece mlađe od godinu dana. Do rezultata sličnih ovima došli su i autori istraživanja provedenog u Splitu (6). Niska stopa rezistencije na kotrimoksazol, a visok udio ESBL-producirajućih sojeva *E. coli* u dječjoj populaciji, može se tumačiti selektivnim pritiskom upotrebe beta-laktamskih antibiotika uz nemogućnost ili vrlo nisku stopu kotransfera rezistencije na kotrimoksazol. Kao što i istraživanja drugih autora izvještavaju o gotovo 100%-tnoj osjetljivosti ESBL-producirajućih izolata na karbapeneme, i u ovom istraživanju niti jedan soj nije pokazivao rezistenciju na imipenem (23, 25, 26).

Rezistencija na kinolone češće je prisutna u ESBL-producirajućih enterobakterija (27). Izolati ESBL-pozitivne *E. coli* bili su svega u 6,3% slučajeva rezistentni na ciprofloksacin, što se nije značajno razlikovalo od, u prethodnom istraživanju, utvrđene rezistencije na norfloksacin ESBL-negativnih izolata *E. coli* izoliranih kod osoba zagrebačkog područja, mlađih od 65 godina starosti, dok je kod starijih osoba postotak rezistencije na norfloksacin u ESBL-negativnih *E. coli* bio značajno viši, te iznosio 13,8% do 23,8% (24). Nasuprot tome, zapažena je vrlo visoka rezistencija ESBL izolata *K. pneumoniae* na ciprofloksacin. Od 1998. godine, kada je prvi put opisana plazmidno kodirana rezistencija na kinolone u *K. pneumoniae*, pa do danas, sve se češće pojavljuju opisi gena kinolonske rezistencije na plazmidu (28-30). Plazmid koji kodira *gmrA* često sadržava i gene za ESBL (SHV-7, CTX-M-9), ampC  $\beta$ -laktamazu FOX-5, te druge

$\beta$ -laktamaze (31). MIK na ciprofloksacin, budući da ga ovaj mehanizam rezistencije uvećava svega 4-8 puta, ponekad ostaje u kategoriji osjetljiv (32). U pokusima konjugacije transkonjugant obično postiže puno niže vrijednosti MIK-a na ciprofloksacin u odnosu na soj donora, što se tumači činjenicom da soj donora, uz plazmidno kodiranu, posjeduje i kromosomalno kodiranu kinolonsku rezistenciju (31, 33, 34). Svakako je potrebno dalje istražiti dva soja *K. pneumoniae* iz ovog istraživanja, u kojih na prisustvo *qnr* gena upućuje MIK ciprofloksacina njihovih transkonjuganata koji je 8-16 puta veći od MIK-a ciprofloksacina recipijentnog soja *E. coli*.

Dosadašnja istraživanja, provedena u Republici Hrvatskoj, obuhvatila su molekularnu tipizaciju bolničkih ESBL-producirajućih sojeva *K. pneumoniae* i utvrdila u različitim razdobljima dominaciju različitih SHV  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (4, 35, 36). Osim ovih istraživanja, kao i nedavno objavljenog prvog opisa CTX-M  $\beta$ -laktamaze u Hrvatskoj, te istraživanja koje je obuhvatilo karakterizaciju  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra bolničkih izolata, nema drugih studija o zastupljenosti pojedinih tipova  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra u Hrvatskoj, a osobito su nedostadni podaci o ESBL-producirajućim izolatima u izvanbolničkoj populaciji (37, 38). U ovom istraživanju ispitana je pripadnost  $\beta$ -laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M PCR reakcijom sa specifičnim primerima za *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> i *bla*<sub>CTX-M</sub> gene. Sekvencioniranje dobivenih PCR produkata nije izvedeno, te se za veliki broj izolata koji posjeduju i TEM i SHV  $\beta$ -laktamazu, ne može utvrditi koja od  $\beta$ -laktamaza pripada porodici  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra. Potrebna je daljnja karakterizacija izoliranih beta-laktamaza metodom sekvencioniranja, kako bi se odredilo koji tipovi TEM i SHV beta-laktamaza pripadaju beta-laktamazama širokog spektra, a koji su tipovi TEM, SHV i CTX-M beta-laktamaza proširenog spektra prisutni u izolatima ispitivane populacije.

Zbog ograničenog izbora antibiotika u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim ESBL-producirajućim izolatima, potrebno je daljnje aktivno praćenje njihove učestalosti, te eventualnog širenja u izvanbolničkoj populaciji zagrebačke regije.

## ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

## LITERATURA

1. Borer A, Gilad J, Menashe G, Peled N, Riesenber K, Schlaeffer F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in Southern Israel. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR44-CR47.
2. Daza R, Gutierrez J, Piedrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18:211-5.
3. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacotherapy* 2002; 22:14-20.
4. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. *J Chemother* 1998; 10:449-59.
5. Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V and the Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:14-8.
6. Tonkić M, Goić Barišić I, Punda-Polić V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Int Microbiol* 2005; 8:119-24.
7. Tambić T, Tambić A, Kalenić S, Gilić V, Krakar B, Payerl-Pal M, Petanović M, Punda-Polić V, Radolović L, Rittnerman I, Sokal A, Šterk-Kuzmanović N, Tkalec N, Vuković D. Monitoring bacterial resistance to antibiotics in the Croatian Republic. *Liječ Vjesn* 2000; 122:160-4.
8. Akademija Medicinskih Znanosti Hrvatske, Rezistencija bakterija na antibiotike u RH, Izvještaji; <http://www.amzh.hr/cro/index-cro.htm>
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S13 (M2). NCCLS, Wayne, Pennsylvania USA, 2003.
10. 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.
11. Philippon AM, Paul GC, Jacoby GA. Properties of PSE-2 beta-lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:362-9.
12. Bedenić B. Biokemijska tipizacija beta-laktamaza proširenog spektra u kliničkim izolatima *Klebsiella pneumoniae*. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1998.
13. Pitout JDD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: importance of community isolates with *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38:36-1741.
14. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.
15. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, Perez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1089-94.
16. Krawczyk B, Samet A, Czarniak E, Szczapa J, Kur J. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: control of an outbreak using a new ADSRRS technique. *Pol J Microbiol* 2005; 54:105-10.
17. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, Villari P, Zarrilli R. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:979-82.
18. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995; 21:915-23.
19. Pitout JDD, Thompson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Coudron P, Sanders CC. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:596-600.
20. Essack SY. Treatment options for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producers. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190:181-4.
21. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, Schwaber MJ, Carmeli Y. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1150-6.
22. Francicsek R, Krzyzanowska B, Dolna I, Mokracka G, Szufnarowski K. Extended-spectrum beta-lactamase-conferring transferable resistance to different antimicrobial agents in *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50:119-24.
23. Francicsek R, Dolna I, Krzyzanowska B, Szufnarowski K, Kowalska-Krochmal B, Zielinska M. Conjugative transfer frequency of resistance genes from ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from patients hospitalized in pediatric wards. *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58:41-51.
24. Marijan T, Mlinarić-Džepina A, Vraneš J, Leskovic V, Knežević J, Matica B. Odlike infekcija mokraćnog sustava kod starijih izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije. *Med Glas* 2007; 4:8-13.
25. Colodner R, Samra Z, Keller N, Sprecher H, Block C, Peled N, Lazarovitch T, Bardenstein R, Schwartz-Harari O, Carmeli Y, the Israel ESBL Group. First national surveillance of susceptibility of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to antimicrobials in Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:201-5.
26. Liao CH, Sheng WH, Wang JT, Sun HY, Wang HK, Hsueh PR, Chen YC, Chang SC. In vitro activities of 16 antimicrobial agents against clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in two regional hospitals in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39:59-66.
27. Arslan H, Azap ÖK, Ergönül Ö, Timurkaynak F on behalf of the Urinary Tract Infection Study Group. Risk

- factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. J Antimicrob Chemother 2005; 56:914-8.
28. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 1998; 351:797-9.
  29. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:801-3.
  30. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1178-82.
  31. Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Pascual A, Garcia I, Martinez-Martinez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. Clin Microbiol Infect 2006; 12:440-5.
  32. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French University Hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:3992-7.
  33. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:559-62.
  34. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1295-9.
  35. Bedenić B, Randegger CC, Stobberingh E, Hachler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:505-8.
  36. Bedenić B, Schmidt H, Herold S, Monaco M, Plečko V, Kalenić S, Katić S, Škrin-Šubić J. Epidemic and endemic spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia. J Chemother 2005; 17:367-5.
  37. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I, Katić S, Kalenić S, Kaufmann ME, Woodford N, Punda-Polić V. First report of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates from Croatia. J Chemother 2007; 19:97-100.
  38. Jajić-Benčić I, Bedenić B, Mikoc A. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* causing nosocomial infections in a Zagreb University Hospital. J Chemother 2009; 21:282-9.

## Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine of nonhospitalized patients in the Zagreb region

Tatjana Marijan<sup>1</sup>, Vanda Plečko<sup>2</sup>, Jasmina Vraneš<sup>1</sup>, Ana Mlinarić Džepina<sup>1</sup>, Branka Bedenić<sup>2</sup>, Smilja Kalenić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>"Dr. Andrija Štampar" Institute of Public Health, <sup>2</sup>University Hospital Centre Zagreb; Zagreb, Croatia

### ABSTRACT

**Aim** To determine the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine of nonhospitalized patients during a three-year period, to determine their antibiotic susceptibility, investigate the transfer of ESBL genes with cotransfer of resistance and to characterize isolated beta-lactamases.

**Methods** Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion and broth microdilution methods. The double-disk test was used for ESBL detection. Transfer of resistance was performed by broth mating method and characterization of isolated beta-lactamases by polymerase chain reaction.

**Results** The prevalence of ESBL-producing *E. coli* was 1.5% and of *K. pneumoniae* 4.1% with its different distribution according to patients' age and gender. ESBL-producing *K. pneumoniae* showed high resistance rates to aminoglycosides, cotrimoxazole, nitrofurantoin and quinolones while ESBL-producing *E. coli* isolates with exception of high aminoglycoside resistance, but low resistance rates to other antibiotics. Successful conjugation of ESBL genes was obtained with 25% *E. coli* and 76.2% *K. pneumoniae* strains. Comparing to *E. coli*, *K. pneumoniae* strains showed higher rates of aminoglycoside and cotrimoxazole resistance cotransfer. Beta-lactamases of investigated strains belonged to TEM, SHV and CTX-M families.

**Conclusion** The existence of multiple-resistant ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains was confirmed in observed outpatient population. ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates, in contrast to ESBL-producing *E. coli*, showed higher resistance rates to non-beta-lactam antibiotics, probably caused by cotransfer of resistance genes located on the same plasmid as ESBL genes. It is important to monitor the prevalence of such strains and their possible spreading in the outpatient population of the Zagreb region.

**Key words:** urinary tract infections, conjugation, cotransfer of resistance

**Original submission:** 13 October 2009; **Revised version:** 14 December 2009; **Accepted:** 18 December 2009.