

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA JEREB

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TINA JEREB

**OPREDELITEV OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ, KI IZLOČAJO
BETALAKTAMAZE RAZŠIRJENEGA SPEKTRA DELOVANJA, NA
PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM**

**DETERMINATION OF SUSCEPTIBILITY FOR *ENTEROBACTERIACEAE*,
THAT PRODUCE EXTENDED SPECTRUM BETALACTAMASES, TO
PIPERACILLIN WITH TAZOACTAM**

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij (ENT) pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružić - Sabljic, dr. med., in somentorstvom asist. dr. Mateje Pirš, dr. med.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Evi Ružić - Sabljic, dr. med., ker mi je omogočila izvajanje diplomske naloge ter mi strokovno in prijazno svetovala pri izdelovanju le-te. Iskrena hvala somentorici asist. dr. Mateji Pirš, dr. med., za strokovno usmerjanje pri načrtovanju in izvedbi praktičnega laboratorijskega dela ter izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi sodelavkam v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij za nasvete in pomoč pri izvedbi praktičnega dela. Hvala staršem, Romanu in prijateljem, ker ste vztrajali z mano.

Hvala tudi Anici Kumer, slavistki, ki je jezikovno pregledala mojo diplomsko nalogo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružić - Sabljic, dr. med., in somentorstvom asist. dr. Mateje Pirš, dr. med.

Ljubljana, maj 2015

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Robert Roškar

VSEBINA

1 UVOD	1
1.1 ENTEROBAKTERIJE – SPLOŠNI PREGLED.....	1
1.2 ANTIBIOTIKI	2
1.2.1 PIPERACILIN.....	3
Lastnosti piperacilina.....	4
Mehanizem delovanja piperacilina.....	4
Farmakologija piperacilina.....	5
1.2.2 TAZOBAKTAM.....	6
Lastnosti tazobaktama.....	6
1.2.3 PIPERACILIN-TAZOBAKTAM.....	7
1.3 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM	8
1.3.1 OBLIKE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI	8
1.3.2 ODPORNOST NA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE.....	9
S penicilin vezočimi proteini (PBP) posredovana odpornost	9
Z betalaktamazami posredovana odpornost.....	9
1.3.3 BETALAKTAMAZE RAZŠIRJENEGA SPEKTRA DELOVANJA, ESBL.....	11
Zgodovina širjenja enterobakterij, ki izločajo ESBL.....	11
1.4 METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI	12
1.4.1 DILUCIJSKE METODE	13
Mikrodilucija	13
1.4.2 DIFUZIJSKE METODE	14
Difuzijski antibiogram	14
Gradient difuzijska metoda.....	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 BAKTERIJSKI SEVI	17
3.1.1 IZBIRA BAKTERIJSKIH SEVOV.....	17
3.1.2 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA ZA KULTIVACIJO SEVOV.....	18
3.1.3 KULTIVIRANJE IZOLIRANIH SEVOV	18
3.2 MIKRODILUCIJSKA METODA DOLOČANJA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ANTIBIOTIKA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM	19
3.2.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA	19
3.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN ANTIBIOTIKA.....	20
3.2.3 PRIPRAVA INOKULUMA.....	23
3.2.4 IZVEDBA MIKRODILUCIJSKEGA ANTIBIOGRAMA	23

3.2.5 DOLOČEVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ANTIBIOTIKA	25
3.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE Z METODO DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI	26
3.3.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA	26
3.3.2 IZVEDBA METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI	26
3.4 GRADIENT DIFUZIJSKA METODA ZA DOLOČANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ANTIBIOTIKA	28
3.4.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA	29
3.4.2 IZVEDBA GRADIENT DIFUZIJSKIH TESTOV.....	29
3.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE.....	31
3.5.1 STANDARD CLSI.....	32
3.5.2 STANDARD EUCAST.....	32
3.5.3 STATISTIČNA ANALIZA.....	33
χ^2 test neodvisnosti	33
Cohenov koeficient kappa.....	33
4 REZULTATI.....	35
4.1 OPREDELITEV OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ S TREMI RAZLIČNIMI METODAMI GLEDE NA SMERNICI CLSI IN EUCAST.....	35
4.1.1 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE.....	36
4.1.2 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z DISK DIFUZIJSKO METODO.....	38
4.1.3 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z GRADIENT DIFUZIJSKO METODO.....	38
4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MINIMALNIH INHIBITORSKIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z METODO MIKRODILUCIJE, Z REZULTATI TESTIRANJA Z DISK DIFUZIJSKO METODO, INTERPRETIRANO PO CLSI IN EUCAST.....	40
4.2.1 DISK DIFUZIJSKA METODA PO CLSI Z DISKOM PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM 110 μ g	40
4.2.2 DISK DIFUZIJSKA METODA PO EUCAST Z DISKOM PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM 36 μ g	42
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV MINIMALNIH INHIBITORSKIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z METODO MIKRODILUCIJE, Z REZULTATI TESTIRANJA MINIMALNIH INHIBITORSKIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z GRADIENT DIFUZIJSKIMI TESTI DVEH RAZLIČNIH PROIZVAJALCEV, INTERPRETIRANO PO CLSI IN EUCAST..	44
4.3.1 GRADIENT DIFUZIJSKI TEST – INTERPRETACIJA PO CLSI	44
Gradient difuzijski test proizvajalca Biomerieux – Interpretacija po CLSI – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije	44
Gradient difuzijski test proizvajalca Liofilchem – Interpretacija po CLSI – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije	46
4.3.2 GRADIENT DIFUZIJSKI TEST – INTERPRETACIJA PO EUCAST.....	48

Gradient difuzijski test Biomerieux – Interpretacija po EUCAST – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije	48
Gradient difuzijski test Liofilchem – Interpretacija po EUCAST – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije	50
5 RAZPRAVA	53
6 SKLEP	57
7 LITERATURA	58

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: OBČUTLJIVOST <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> NA ANTIBIOTIKE V SPLOŠNEM IN NJUNIH ESBL IZOLATOV	1
PREGLEDNICA II: KLASIFIKACIJA BETALAKTAMAZ	10
PREGLEDNICA III: SESTAVA GOJIŠČA COLUMBIA	18
PREGLEDNICA IV: NAČRT PRIPRAVE MIKROTITRSKIH PLOŠČ ZA ANTIBIOGRAM	24
PREGLEDNICA V: SESTAVA GOJIŠČA MUELLER HINTON II AGAR (MHA)	27
PREGLEDNICA VI: REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI REFERENČNEGA SEVA <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN INTERPRETACIJA REZULTATOV PO STANDARDIH EUCAST IN CLSI	31
PREGLEDNICA VII: INTERPRETATIVNI KRITERIJI ZAVIRALNIH CON IN MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ PO CLSI	32
PREGLEDNICA VIII: INTERPRETATIVNI KRITERIJI ZAVIRALNIH CON IN MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ PO EUCAST	33
PREGLEDNICA IX: INTERPRETACIJA REZULTATOV ZANESLJIVOSTI	34
PREGLEDNICA X: OBČUTLJIVOST VSEH 72 SEVOV ENTEROBAKTERIJ	35
PREGLEDNICA XI: PRIMERJAVA RAZPOREDITVE OBČUTLJIVOSTI ENETEROBAKTERIJ PRI MIKRODILUCIJI GLEDE NA CLSI IN EUCAST	37
PREGLEDNICA XII: PRIMERJAVA RAZPOREDITVE OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ PRI DISK DIFUZIJI GLEDE NA CLSI IN EUCAST. .	38
PREGLEDNICA XIII: PRIMERJAVA RAZPOREDITVE OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ PRI GRADIENT DIFUZIJI GLEDE NA CLSI IN EUCAST.	39
PREGLEDNICA XIV: PRIMERJAVA RAZPOREDITVE OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ PO RAZLIČNIH KRITERIJIH SMERNIC CLSI IN EUCAST.	39
PREGLEDNICA XV: PRIMERJAVA METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI S KONCENTRACIJO PIPERACILINA S TAZOBAKTAMOM 110 µg IN REFERENČNE METODE MIKRODILUCIJE PO CLSI.	40
PREGLEDNICA XVI: PRIMERJAVA METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI S KONCENTRACIJO PIPERACILINA S TAZOBAKTAMOM 36 µg Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE	42
PREGLEDNICA XVII: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA PROIZVAJALCA BIOMERIEUX Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE PO KRITERIJU CLSI.	44
PREGLEDNICA XVIII: PRIMERJAVA REZULTATOV, PRIDOBLENIH Z GRADIENT DIFUZIJSKIM TESTOM PROIZVAJALCA LIOFILCHEM, Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE, PO KRITERIJU CLSI.	47

PREGLEDNICA XIX: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA BIOMERIEUX Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE PO EUCAST.	49
PREGLEDNICA XX: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA LIOFILCHEM Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE PO EUCAST.	50

KAZALO SLIK

SLIKA 1: OSNOVNA STRUKTURA VSEH PENICILINOV	3
SLIKA 2: KEMIJSKA STRUKTURA PIPERACILINA	4
SLIKA 3: SHEMA PLASTI PEPTIDOGLIKANA BAKTERIJSKE CELICE	5
SLIKA 4: KEMIJSKA STRUKTURA TAZOBAKTAMA	7
SLIKA 5: SERINSKE BETALAKTAMAZE IN NJIHOVE REAKCIJE Z DONORJI KARBONILNIH SKUPIN BETALAKTAMI	10
SLIKA 6: MIKROTITRSKA PLOŠČA ZA IZVEDBO MIKRODILUCIJE V BUJONU	13
SLIKA 7: IZDELAVA DIFUZIJSKEGA ANTIBIOGRAMA	14
SLIKA 8: ETEST [®] (BIOMERIEUX) ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM (PTc)	15
SLIKA 9: MODEL MIKROTITRSKE PLOŠČE	24
SLIKA 10: DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM, MERJENJE PREMERA ZAVIRALNIH CON OB DISKIH Z ANTIBIOTIKI	28
SLIKA 11: NAČIN POLAGANJA GRADIENT DIFUZIJSKIH TESTOV NA MUELLER HINTON AGAR V PETRIJEVKI	30
SLIKA 12: PRIMER PRAVILNEGA ODČITAVANJA MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE	30
SLIKA 13: PORAZDELITEV MINIMALNIH INHIBITORSKIH KONCENTRACIJ REFERENČNE METODE MIKRODILUCIJE PO KRITERIJIH SMERNIC CLSI IN EUCAST ZA VSEH 72 ENTEROBAKTERIJ.	37
SLIKA 14: PRIMERJAVA MIKRODILUCIJE IN METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI S KONCENTRACIJO PIPERACILINA S TAZOBAKTAMOM 100/10 µg, TESTIRANO IN INTERPRETIRANO PO CLSI.	41
SLIKA 15: PRIMERJAVA REFERENČNE METODE MIKRODILUCIJE IN METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI S KONCENTRACIJO PIPERACILINA S TAZOBAKTAMOM 30/6 µg.	43
SLIKA 16: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA BIOMERIEUX Z MIKRODILUCIJO PO KRITERIJIH SMERNICE CLSI.	46
SLIKA 17: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA LIOFILCHEM Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE, INTERPRETIRANO PO CLSI.	48
SLIKA 18: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA BIOMERIEUX Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE PO EUCAST.	50
SLIKA 19: PRIMERJAVA GRADIENT DIFUZIJSKEGA TESTA LIOFILCHEM Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE, INTERPRETIRANO PO EUCAST.	52

POVZETEK

Kombinacija piperacilina in tazobaktama je ena izmed ključnih zdravilnih učinkovin za izkustveno in usmerjeno zdravljenje sistemskih in drugih resnih okužb z enterobakterijami, ki izločajo encime betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Po podatkih iz literature je znano, da je testiranje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri tovrstnih bakterijah lahko težavno, saj opažamo neskladje med rezultati testiranja ob uporabi različnih metod.

Namen diplomske naloge je bil opredelitev minimalne inhibitorne koncentracije izbranih sevov za piperacilin s tazobaktamom z referenčno metodo mikrodilucije in gradient difuzijsko metodo ter primerjava rezultatov z rezultati testiranja metode difuzije v agarju z diski. Na podlagi dobljenih rezultatov smo opredelili, katera od rutinsko uporabljenih metod je najprimernejša za rutinsko opredelitev občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri izolatih enterobakterij, ki izločajo encime betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja.

V raziskavo smo vključili 72 izolatov enterobakterij, ki izločajo encime betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, iz laboratorijske zbirke Laboratorija za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri vseh izolatih smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo z referenčno metodo in gradient difuzijsko metodo s testi dveh različnih proizvajalcev. Določili smo tudi občutljivost z disk difuzijsko metodo z uporabo antibiotičnih diskov z dvema različnima koncentracijama v skladu s priporočili CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA – inštitut za klinične in laboratorijske standarde, ZDA) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti). Rezultate testiranja občutljivosti smo interpretirali po priporočilih CLSI in EUCAST. Razlike med rezultati metod disk difuzije in gradient difuzije smo primerjali z rezultati referenčne metode.

Na podlagi naših rezultatov smo ugotovili, da sta pri uporabi kriterijev CLSI najprimernejši metodi za določanje občutljivosti gradient difuzijska metoda proizvajalca Liofilchem in disk difuzijska metoda z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg. Podobne rezultate smo dobili tudi pri uporabi kriterijev EUCAST: rezultati testiranja z disk difuzijsko metodo so primerljivi z gradient difuzijsko metodo proizvajalca Liofilchem in primerni za rutinsko določanje občutljivosti v kliničnem laboratoriju.

KLJUČNE BESEDE:

piperacilin s tazobaktamom, mikrodilucija, metoda difuzije v agarju z diski, gradient difuzijska metoda

ABSTRACT

The combination of piperacillin and tazobactam is one of the key active ingredients for empirical and directed treatment of systemic and other serious infections with *Enterobacteriaceae* that produce extended spectrum betalactamases. Antimicrobial susceptibility testing for piperacillin with tazobactam for ESBL-producing *Enterobacteriaceae* can be difficult as discrepancies between the test results using different methods can arise.

The aim of this diploma thesis was the determination of the minimum inhibitory concentration of piperacillin with tazobactam for selected strains using both the reference microdilution method and gradient diffusion method and comparison of these results with the results of the disc diffusion method. This has enabled us to determine which routinely used method is the most suitable for the routine determination of susceptibility to piperacillin with tazobactam for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

The study included 72 isolates of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, from the laboratory strain collection of the Laboratory for bacteriological diagnosis of intestinal infections at the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine in Ljubljana. We have determined minimum inhibitory concentration using the reference broth microdilution method and gradient diffusion method using strips from two different manufacturers. We have also determined the susceptibility using the disk diffusion method using antibiotic discs according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) and EUCAST (European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing) guidelines. The results of susceptibility testing were interpreted according to CLSI and EUCAST guidelines. The results of disk diffusion and gradient diffusion method were compared with the results of the reference broth microdilution method.

Our study has shown that, using CLSI criteria, the most accurate routine methods for determining the susceptibility are gradient diffusion method using Liofilchem strips and disc diffusion method using discs with concentration of piperacillin with tazobactam 110 µg. We have obtained similar results using EUCAST criteria: test results of the disc diffusion method are comparable with the gradient diffusion method using Liofilchem strips and are suitable for the determination of the susceptibility to piperacillin with tazobactam in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in routine work in a clinical laboratory.

KEY WORDS:

piperacillin with tazobactam, microdilution, disc diffusion method, gradient diffusion method

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	angl. American Type Culture Collection
CAMHB	Mueller Hintonov bujon s prilagojeno koncentracijo kationov (angl. Cation Adjusted Mueller Hinton Bujon)
CLSI	inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
ESBL	betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. Extended Spectrum betalactamases)
EUCAST	evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry)
MHA	Mueller Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
PBP	penicilin vežočni proteini (angl. penicillin-binding proteins)
spp.	vrsta (lat. species)

1 UVOD

Vsak živ organizem je dovzeten za okužbe in ljudje nismo nobena izjema temu pravilu. Uporaba kemoterapevtikov sega nazaj do Ehrlicha in razvoja salvarzana (arsfenamin) za zdravljenje sifilisa. Uspešen razvoj takih učinkovin v preteklem stoletju, posebno 'antibiotična revolucija', je eden pomembnejših terapevtskih napredkov zgodovine medicine. Vendar pa je ta napredek vzporeden z razvojem odpornosti na učinkovine, še posebno bakterijske odpornosti na antibiotike, ki zadnje čase predstavlja resen problem (1).

1.1 ENTEROBAKTERIJE – splošni pregled

Enterobakterije so po Gramu negativni bacili, katerih glavna predstavnika sta *Escherichia coli* (*E. coli*) in *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), pomembni predstavniki so tudi rodovi *Salmonella*, *Enterobacter* in drugi. So med najpomembnejšimi in najpogostejšimi povzročitelji okužb tako v domačem kot tudi v bolnišničnem okolju. Prizadenejo lahko sicer zdrave osebe ter bolnike z različnimi osnovnimi boleznimi. Naravno okolje večine medicinsko pomembnih enterobakterij je spodnji gastrointestinalni trakt, najdemo pa jih tudi v naravnem okolju v vodi in zemlji. Pri človeku so pomemben del normalne črevesne flore, relativno redko pa jih najdemo v normalni flori na drugih mestih (2). Povzročajo približno 70 % okužb sečil, 30–35 % bakteriemij in veliko okužb gastrointestinalnega trakta (3). Povzročajo pomemben delež okužb v trebušni votlini ter okužb dihal. Najdemo jih lahko tudi v likvorju, sklepni tekočini in v abscesih (2). Občutljivost *E. coli* in *K. pneumoniae* v splošnem in njihovih ESBL (betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, angl. Extended Spectrum betalactamases) izolatov prikazuje preglednica I (4).

Preglednica I: Občutljivost *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike v splošnem in njihovih ESBL izolatov (4).

Vrsta (število izolatov)	AM	AMC	TZP	CXM or.	CXM i.v.	CTX/ CRO	CAZ	ETP	IPM	GM	AN	CIP	SXT	CF	FM
<i>E. coli</i> (14887)	50	82	96	76	91	93	95	100	100	93	99	82	73	57	98
<i>E. coli</i> ESBL (915)	0	23	84	0	1	1	40	100	100	53	93	15	22	0	91

<i>K. pneumoniae</i> (3590)	0	73	87	63	74	75	77	99	100	91	98	74	70	64	55
<i>K. pneumoniae</i> ESBL (769)	0	7	57	0	1	1	6	98	100	69	94	5	7	0	29

AM – ampicilin, AMC – amoksisicilin s klavulansko kislino, TZP – piperacilin s tazobaktamom, CXM or. – cefuroksim oralni, CXM i.v. – cefuroksim parenteralni, CTX/CRO – cefotaksim/ceftriakson, CAZ – ceftazidim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, GM – gentamicin, AN – amikacin, CIP – ciprofloksacin, SXT – trimetoprim-sulfametoksazol, CF – cefalotin (rezultat velja samo za okužbe sečil), FM – nitrofurantoin (rezultat velja samo za okužbe sečil)

Po podatkih slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ) je večina prvih izolatov *E. coli* in *K. pneumoniae* občutljivih za TZP (piperacilin s tazobaktamom). V kolikor bakteriji izločata encime ESBL, pa je občutljivost slabša in pade na 84 % v primeru *E. coli* – ESBL in 57 % v primeru *K. pneumoniae* – ESBL (4).

1.2 ANTIBIOTIKI

Protimikrobna kemoterapija igra pomembno vlogo pri zdravljenju infekcijskih bolezni, vse odkar je leta 1928 Alexander Fleming odkril penicilin (5). Antibiotiki so kemične substance, ki delujejo tako, da ubijejo bakterije ali pa zavirajo njihovo rast. Lahko so naravni produkti nekaterih mikroorganizmov ali pa so pridobljeni sintezno s kemijsko spremembo naravnega antibiotika (6). Selektivna biološka aktivnost antibiotikov proti mikroorganizmom, kot tudi njihova nizka toksičnost, jim omogoča uničevanje mikrobov *in vivo* (7).

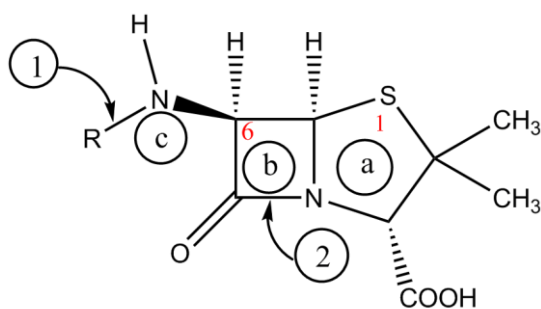
Po mehanizmu delovanja antibiotike razvrstimo v štiri skupine, in sicer na 1) antibiotike, ki zavirajo sintezo celične stene bakterij; 2) antibiotike, ki zavirajo sintezo znotrajceličnih beljakovin, 3) antibiotike, ki zavirajo sintezo jedrnih kislin ter na 4) antibiotike, ki zavirajo delovanje citoplazemske membrane (8).

Antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene bakterij, natančneje antibiotiki, ki zavirajo sintezo peptidoglikana, delujejo po istem splošnem principu. Celična stena bakterij vsebuje peptidoglikan, ki je pri po Gramu negativnih bakterijah sestavljen iz ene plasti, pri po Gramu pozitivnih pa ima lahko tudi 40 plasti. Vsaka plast je sestavljena iz ogrodja amino sladkorjev, kjer se izmenjujeta N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminska kislina. Slednja ima kratke stranske peptidne verige, ki so prečno povezane, tako da tvorijo polimerno

mrežo, ki je dovolj močna, da se upira visokemu notranjemu osmotskemu tlaku. Sinteza peptidoglikana poteka v več stopnjah. Najprej se N-acetilmuraminska kislina, pripeta na uridin difosfat (UDP) in pentapeptid, prenese na lipidni prenašalec C55 v membrani, pri tem se sprost uridin monofosfat. Sledi reakcija z UDP-N-acetilglukozaminom, katere produkt je kompleks disaharid-pentapeptid, pritrjen na prenašalec. Ta kompleks je osnovni gradnik peptidoglikana. V tej stopnji se pritrdijo na peptidno verigo še aminokislinski ostanki, nato pa se gradnik prenese na zunanost celice, kjer se doda rastočemu koncu peptidoglikana, sprost pa se lipid C55, ki ima še vedno pripeta dva fosfata. Ko se lipidni prenašalec znebi ene fosfatne skupine, je spet na razpolago za naslednji cikel. Na koncu se prečno povežejo še stranske verige peptidov sladkornih ostankov v peptidoglikanu, potrebno energijo pa zagotovi hidroliza terminalnega alanina (1).

1.2.1 PIPERACILIN

Piperacilin je širokospektralni polsintezni betalaktamski antibiotik, ki spada med peniciline, natančneje med ureidopeniciline (9). Deluje proti številnim po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim aerobnim in anaerobnim bakterijam (10). Penicilini so skupina naravnih (izdelujejo jih plesni iz rodu *Penicillium*) in polsinteznih antibiotikov, ki imajo kot osnovno strukturo 6-aminopenicilansko kislino, ki je nujna za biološko aktivnost penicilinov. Strukturo 6-aminopenicilanske kisline prikazuje slika 1 (11).



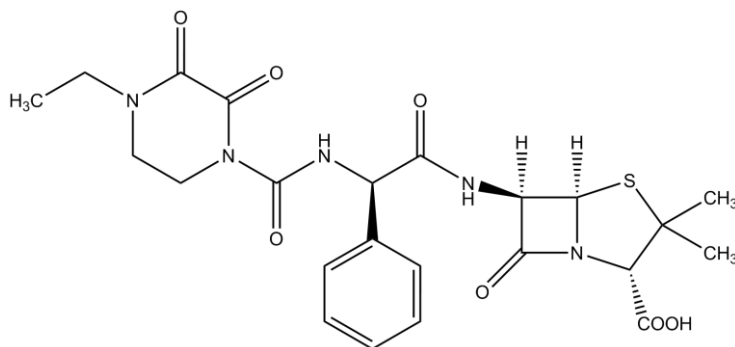
6-aminopenicilanska kislina

Slika 1: Osnovna struktura vseh penicilinov: tiazolidinski obroč (a) je pritrjen na betalaktamski obroč (b), ki nosi prosto amino skupino (c). Kisli radikali, pritrjeni na amino skupino, se lahko odcepijo z bakterijskimi amidazami (1). Če betalaktamski obroč

prekinejo betalaktamaze (penicilinaze), nima produkt (peniciloična kislina) nobene protibakterijske aktivnosti več (2) (11).

Lastnosti piperacilina

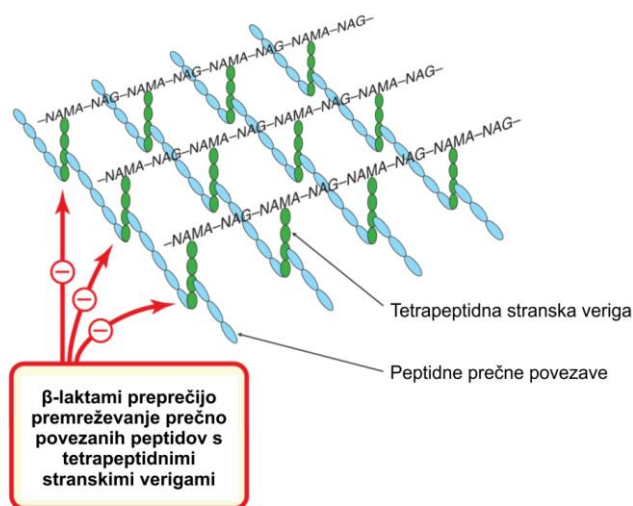
Piperacilin je piperazinski derivat ampicilina. Molekulska formula je $C_{23}H_{27}N_5O_7S$. Njegova molekulska masa znaša 517,55478 g/mol. Kemijsko IUPAC (Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo, angl. International Union of Pure and Applied Chemistry) ime piperacilina je (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[*(2R)*-2-[(4-etil-2,3-dioksopiperazin-1-karbonil)amino]-2-fenilacetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kislina (12). Kemijska struktura piperacilina je prikazana na sliki 2 (13).



Slika 2: Kemijska struktura piperacilina (13).

Mehanizem delovanja piperacilina

Baktericidno delovanje piperacilina je rezultat zaviranja sinteze celične stene bakterij, kar je posledica vezave piperacilina na penicilin vežoče proteine (PBP, angl. penicillin-binding proteins). PBP so encimi karboksi-peptidaze in transpeptidaze, ki imajo nalogo pri uvrščanju N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamina v peptidoglikansko verigo. S tem ko se piperacilin veže na PBP, ki je v bakterijski celični steni, zavre zadnjo stopnjo sinteze bakterijske celične stene, transpeptidacijo. Piperacilin tvori s PBP kovalentne vezi in tako prepreči tvorbo navzkrižnih povezav, povezovanje peptidoglikanov v polimerno mrežo. Lizo celice nato katalizirajo avtolitični encimi (avtolizini) bakterijske celične stene (14). Slika 3 prikazuje mehanizem delovanja betalaktamov (piperacilina) (1).



Slika 3: Shema plasti peptidoglikana bakterijske celice, ki prikazuje mesto delovanja betalaktamskih antibiotikov (NAMA – N-acetilmuraminska kislina; NAG – N-acetilglukozamin) (1).

Farmakologija piperacilina

Piperacilin se aplicira parenteralno in je aktivnejši *in vitro* od ostalih širokospektralnih penicilinov (15). Uporablja se za zdravljenje intraabdominalnih in ginekoloških okužb, okužb spodnjega dela respiratornega trakta, sepse, gonokoknega uretritisa, okužbe kože in kožnih struktur ter kosti in sklepov. Uporablja se tudi za kirurško profilakso (16). Piperacilin je najučinkovitejši takrat, ko njegova koncentracija v plazmi presega MIK ($t > \text{MIK}$; t – čas nad MIK, ki je glavna farmakodinamična determinanta učinkovitosti piperacilina; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija). Najvišjo koncentracijo v plazmi doseže takoj po koncu intravenskega infundiranja ali injiciranja. Na plazemske beljakovine se ga veže 20–30 %. Obsežno se porazdeljuje v tkiva in telesne tekočine, vključno s črevesno sluznico, žolčem, žolčnikom, pljuči in kostmi. Presnovi se v desetil presnovek, ki je mikrobiološko manj aktiven.

Izloča se hitro preko ledvic z glomerulno filtracijo in s tubulno sekrecijo, v nespremenjeni obliki, zato lahko v urinu zasledimo 68 % apliciranega odmerka. Piperacilin in desetil piperacilin se izločata tudi z žolčem (17). Sicer pa piperacilin, kot tudi ostali betalaktami, ni toksičen za celice sesalcev, saj se peptidoglikan ne nahaja v živalskih celicah (11). Neželeni učinki, ki se pojavljajo pri penicilinih, so alergične kožne reakcije, diareja,

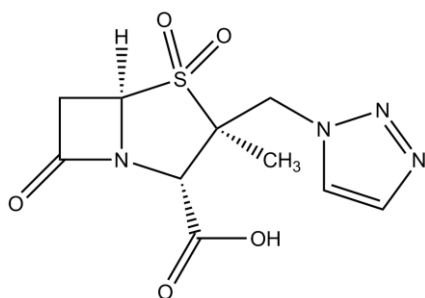
nevtropenija. Anafilaktične reakcije se pojavljajo redko, vendar so lahko usodne. Tudi trombocitopenija in hemolitična anemija s pozitivnim Coombsovim testom sta redka zapleta zdravljenja s penicilini. Pri ureidopenicilinih se lahko pojavi nagnjenost h krvavitvam zaradi motene funkcije trombocitov (5). Ta zaplet je sicer zelo redek, če pa že pride do njega, je razlog v zmanjšanem odgovoru agregacije trombocitov na adenozin difosfat, adrenalin, kolagen in arahidonsko kislino (18).

1.2.2 TAZOBAKTAM

Tazobaktam je zaviralec betalaktamaz, sulfonski derivat penicilanske kisline, ki je strukturno soroden sulbaktamu in se veže na bakterijski PBP 1 ali PBP 2. Čeprav ima sam po sebi zelo slabo intrinzično antibakterijsko aktivnost proti organizmom, ki izdelujejo betalaktamaze, je primerljiv s klavulanatom in sulbaktamom v zniževanju MIK mnogih organizmov tudi do 20-krat, kadar je v kombinaciji z betalaktami. Tazobaktam aktivno zavira betalaktamaze stafilokokov in bakterij *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella* spp. in *Porphyromonas* spp. Aktiven je tudi proti razredu I betalaktamaz (Amblerjev razred C) rodu *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* in *Morganella*, ni pa aktiven proti *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* in nekaterim betalaktamazam, ki jih najdemo pri *Klebsiella* spp. (5).

Lastnosti tazobaktama

Tazobaktam je triazolilmetilsulfon penicilanske kisline, ima osnovno zgradbo penicilinov. Kemijska formula je $C_{10}H_{12}N_4O_5S$, molekulska masa pa znaša 300,29108 g/mol (19). IUPAC ime tazobaktama je (2S,3S,5R)-3-metil-4,4,7-triokso-3-(1H-1,2,3-triazol-1-ilmetil)-4-tia-1-azabiciklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kislina (14). Slika 4 prikazuje kemijsko strukturo tazobaktama (20).



Slika 4: Kemijska struktura tazobaktama (20).

1.2.3 PIPERACILIN-TAZOBAKTAM

Kombinacija piperacilin-tazobaktam se aplicira parenteralno v razmerju 8:1. Piperacilin ne vpliva na metabolizem ali farmakokinetiko tazobaktama. Visoke koncentracije obeh učinkovin dosežejo črevesno sluznico, pljuča in kožo, relativno slaba distribucija pa je v mišicah, maščevju, prostati in cerebrospinalni tekočini (če možganske ovojnice niso vnete, v nasprotnem primeru pride do penetracije) (5). Plazemski razpolovni čas piperacilina in tazobaktama je 0,7 do 1,2 ure (17).

Spekter delovanja kombinacije piperacilin-tazobaktam obsega po Gramu pozitivne bakterije (streptokoki, *Enterococcus faecalis*, za meticilin občutljiv *S. aureus* in *S. epidermidis*), po Gramu negativne bakterije (*N. meningitidis*, *M. catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. in druge enterobakterije, *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa*) ter anaerobne bakterije (21).

Kombinacija piperacilin-tazobaktam se uporablja za zdravljenje intraabdominalnih okužb, povišane telesne temperature neznanega izvora pri nevtropeničnih bolnikih, bolnišnični pljučnici, okužbah kože in mehkih tkiv vključno z okužbami diabetičnega stopala, okužbah sečil, okužbah kosti in sklepov, ginekoloških okužbah in okužbah krvi (22, 23).

Čeprav je kombinacija piperacilin-tazobaktam zelo učinkovita, pa se, tako kot pri drugih antibiotikih, pojavlja odpornost. Glavni mehanizmi odpornosti proti piperacilinu/tazobaktamu so:

- ~ Inaktivacija piperacilinske komponente z betalaktamazami, ki jih tazobaktam ne zavira: betalaktamaze razreda B, C in D. Poleg tega tazobaktam ne zagotavlja zaščite proti ESBL molekulskega razreda A in D encimskih skupin.

- ~ Sprememba PBP (zmanjšana afiniteta piperacilina za tarčno molekulo v bakteriji).
- ~ Spremembe v prepustnosti bakterijske membrane ali izlivne črpalke za več zdravil (angl. 'multi-drug efflux pumps'), še posebej pri Gram negativnih bakterijah (24).

1.3 ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM

Odpornost bakterij na antibiotike velja za eno največjih groženj zdravja ljudi po vsem svetu (25). Poznamo jo že odkar uporabljamo antibiotike za zdravljenje bakterijskih okužb. Zaradi široke uporabe penicilina je že konec 40-ih let prejšnjega stoletja prišlo do selekcije proti penicilinu odpornih sevov (26). Intenzivna in nepravilna uporaba antibiotikov se odraža v odpornosti na antibiotike med več človeškimi patogeni, kar zmanjšuje možnosti za zdravljenje okužb in presaditev organov ali vsadkov, kjer so okužbe pogosti zapleti in je za zdravljenje ali preprečevanje le-teh potrebna antibiotična terapija (27). Najbolj znani izolati odpornih sevov so izolati enterobakterij, ki izločajo encime ESBL, proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* in proti vankomicinu odporni enterokoki (28).

1.3.1 OBLIKE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI

Poznamo dve obliki odpornosti bakterij na antibiotike, naravno ali intrinzično in pridobljeno. Naravna ali intrinzična odpornost je specifična za celo določeno vrsto ali rod in se ne prenaša ter je odraz genetskega in strukturnega stanja bakterije (29). Primer intrinzične odpornosti so po Gramu negativne bakterije, ki so naravno odporne proti naravnemu penicilinu, glikopeptidom in makrolidom (8). Pridobljena odpornost se v nasprotju z naravno pojavlja samo pri nekaterih sevih znotraj vrste ali rodu. Gre za mutacijo kromosomskega ali plazmidnega gena bakterijske celice ali pridobitev nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice s konjugacijo ali transformacijo (26).

Mehanizmi pridobljene odpornosti so sprememba tarčnega mesta oziroma prijemališča antibiotika (npr. sprememba PBP), encimska razgradnja (npr. razgradnja betalaktamskih antibiotikov z betalaktamazami), sprememba presnovne poti (npr. zaviranje sinteze timina v bakterijski celici povzroči odpornost na sulfonamid in trimetoprim), aktivno črpanje

antibiotika iz celice (npr. odpornost na tetracikline po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij) in zmanjšana prepustnost celične membrane (antibiotiku je preprečen dostop do tarče: sprememba porinov v celični steni pri Gram negativnih bakterijah) (29).

1.3.2 ODPORNOST NA BETALAKTAMSKE ANTIBIOTIKE

Glavni mehanizmi pridobljene odpornosti na betalaktamske antibiotike so sprememba tarčnega mesta oziroma prijemališča antibiotika (sprememba PBP) in encimska razgradnja (razgradnja betalaktamskih antibiotikov z betalaktamazami).

S penicilin vezočimi proteini (PBP) posredovana odpornost

Betalaktamski antibiotiki (penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi) so najširše uporabljeni in najbolj varni antibiotiki. Delujejo z zaviranjem PBP, transpeptidaze, ki izdeluje peptidoglikan. Poznamo več različnih PBP, vsi pa so člani večje družine serinskih peptidaz, ki vključuje tudi večino betalaktamaz. PBP interagirajo z molekulami betalaktama (ki so strukturni analogi peptidil-D-alanil-D-alanin konca peptidoglikanskih prekurzorjev), tako da katalitično prekinejo betalaktamsko vez in dobimo s serinskim estrom povezani acil encimski derivat. S PBP posredovano odpornost najdemo večinoma pri Gram pozitivnih bakterijah (30).

Z betalaktamazami posredovana odpornost

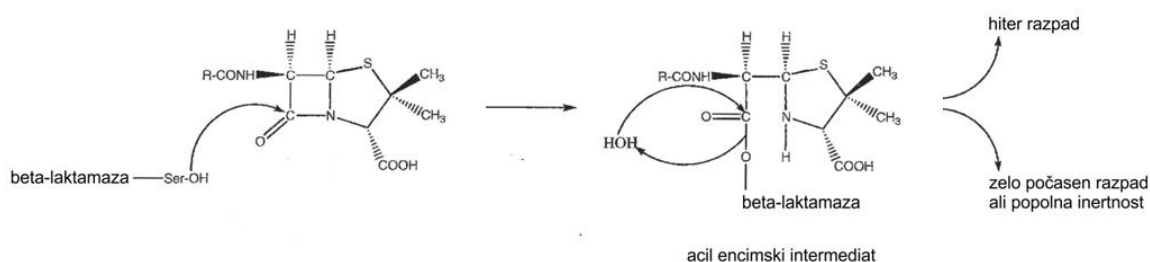
Betalaktamaze razvrščamo glede na strukturno funkcionalne (klasifikacija Bush-Jacoby) in molekularne značilnosti (klasifikacija po Amblerju) v štiri velike skupine. Amblerjeva klasifikacija razdeli betalaktamaze na razrede od A do D, ki temeljijo na podobnostih aminokislinskega zaporedja. Razredi A, C in D so serinske betalaktamaze, encimi razreda B pa so metalo-betalaktamaze, ki za svojo aktivnost potrebujejo enega ali dva cinkova atoma. Bush-Jacoby klasifikacija razvršča betalaktamaze glede na funkcionalne podobnosti (npr. značilnosti substrata in zaviralca) v štiri skupine in več podskupin. Klasifikaciji sta prikazani v preglednici II s primerjavo obeh klasifikacijskih sistemov (30, 31).

Preglednica II: Klasifikacija betalaktamaz (prirejeno po 30, 31).

Bush-Jacoby klasifikacija	Glavna podskupina	Ambler klasifikacija	Glavni substrati	Zaviralci	Glavne značilnosti
Skupina 1: cefalosporinaze		C (cefalosporinaze)	C, P	Kloksacilin, MB	AmpC-tip cefalosporinaz. Navadno kromosomske; odpornost na vse BL razen K
Skupina 2: penicilinaze (občutljive na klavulansko kislino)	2a	A (serinske betalaktamaze)	P	Klav. k.	Gram+; Stafilokokne penicilinaze
	2b	A	P, nekateri C	Klav. k.	Širok spekter: Gram- (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	A	P, 2. in 3. gen C, MB	Klav. k.	ESBL; Razširjen spekter: TEM in SHV različice, pretežno IRT
	2br	A	P	Klav.k./tazob./sulbakt.	TEM odporne na zaviralce; IRT
	2c	A	P, karbenicilin	Klav.k./tazob./sulbakt.	Betalaktamaze, ki hidrolizirajo karbenicilin
	2e	A	C	Klav. k.	Betalaktamaze (cefalosporinaze), ki hidrolizirajo C
	2f	A	P, C, K	Klav. k.	Karbapenemaze, ki jih klavulanat zavira
2d	D (oksacilin hidrolizirajoče)	P, kloksacilin	Klav. k./tazob./sulbakt.	Oksacilin hidrolizirajoče (OXA)	
Skupina 3: metalo-betalaktamaze	3a	B (metaloencimi)	Vsi BL razen MB	EDTA	Cink-odvisne karbapenemaze
	3b				
	3c				
Skupina 4		Neklasificirana			Večinoma še nerazvrščeni encimi

C – cefalosporini, P – penicilini, MB – monobaktami, K – karbapenemi, BL – betalaktami, klav. k. – klavulanska kislina, tazob. – tazobaktam, sulbakt. – sulbaktam, EDTA – etilendiamintetraoacetna kislina

Betalaktamaze spadajo v naddružino serinskih proteaz ali D,D-peptidaz, ki katalitično prekinejo betalaktamsko vez, tako da dobimo s serinskim estrom povezani acil encimski derivat. Slika 5 prikazuje opisano reakcijo (30).



Slika 5: Serinske betalaktamaze in njihove reakcije z donorji karbonilnih skupin betalaktami (30).

V nadaljevanju reakcije na sliki 5 molekula vode hidrolizira estrsko vez acil encimskega intermediata, kar vodi do ireverzibilno poškodovanega peniciloilnega dela molekule in regeneracije aktivnega encima. Mehanizem hidrolize betalaktamov z betalaktamazami je najboljše raziskan za TEM-1. TEM-1 betalaktamaza prekine amidno vez betalaktama v

dvostopenjski reakciji. Najprej pozitivno nabiti konci aktivnega encima privlačijo negativno nabito karboksilatno skupino betalaktamskega antibiotika. Vzpostavi se ključna interakcija povezave betalaktama z encimom preko vodikove vezi. Ostankom aktivne strani encima serinske betalaktamaze, ki olajšajo oziroma pospešijo to privlačnost, rečemo oksanionska luknja ali elektrofilni center. Poteče še aciliranje betalaktama. Ohranjen serin Ser70 v aktivni strani TEM-1 služi kot reaktivni nukleofil v reakciji acilacije. Betalaktamaze se pri po Gramu negativnih bakterijah izločajo v periplazemski prostor, pri po Gramu pozitivnih pa v obkrožajoči medij organizma.

Betalaktamaze so lahko kromosomsko, plazmidno ali transpozonsko kodirani encimi, ki nastanejo konstitutivno ali inducibilno. Lahko so kodirani tudi na integronih (30).

1.3.3 BETALAKTAMAZE RAZŠIRJENEGA SPEKTRA DELOVANJA, ESBL

ESBL so skupina plazmidno posredovanih, raznolikih, kompleksnih in hitro razvijajočih se encimov, ki predstavljajo velik terapevtski izziv. Okužbe zaradi enterobakterij, ki proizvajajo ESBL, segajo od nezapletenih okužb sečil do smrtno nevarne sepse (32). Encimi ESBL hidrolizirajo večino penicilinov in cefalosporine (prve, druge, tretje in četrte generacije) in aztreonam (ne pa tudi cefamicinov in karbapenemov). Večinoma spadajo v Ambler A skupino, zavirajo jih zaviralci betalaktamaz, kot so klavulanska kislina, tazobaktam in sulbaktam (33).

Prvi znani ESBL encimi so se razvili s točkovnimi mutacijami preko spremembe konfiguracije aktivnega mesta izvornih in dolgo poznanih betalaktamaz, imenovanih TEM-1, TEM-2 in SHV-1 (34). Druga največja skupina ESBL so encimi CTX-M (35). Večinoma so se razvili iz kromosomskih genov betalaktamaze, ki izhaja iz *Kluyvera* spp. (rod enterobakterij z majhnim kliničnim pomenom) (32). Redkejši encimi ESBL so betalaktamaze tipa OXA, PER-1, VEB-1, TLA-1 in drugi (32, 36).

Zgodovina širjenja enterobakterij, ki izločajo ESBL

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja so po uvedbi tretje generacije cefalosporinskih antibiotikov pri nekaterih enterobakterijah opazili pojav encimov ESBL iz družin TEM in

SHV. Za okužbe z enterobakterijami, ki so izločale tovrstne encime ESBL, je bilo značilno, da so bile povezane z bolnišničnimi prenosni in izbruhi, pogosteje so se pojavljale pri *K. pneumoniae*. Leta 1989 je bila odkrita nova družina encimov ESBL – CTX-M, ki je bistveno vplivala na epidemiologijo ESBL. Ti encimi se najpogosteje pojavljajo pri *E. coli*, zato jih pogosto odkrijemo pri bolnikih z okužbo, pridobljeno v domačem okolju. Sočasno pa opažajo, da se enterobakterije, ki izločajo encime ESBL, pojavljajo v negovalnih in socialno-varstvenih ustanovah, kar predstavlja pomembno tveganje za vnos in posledično širjenje teh različic encimov ESBL v bolnišnicah. Enterobakterije, ki izločajo encime ESBL, so pogosto odporne tudi proti aminoglikozidom in kinolonom (37).

1.4 METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI

Če želimo ugotoviti, ali je antibiotik primeren za zdravljenje okužbe, ki jo izolirana bakterija povzroča, je potrebno določiti občutljivost bakterij za izbrani antibiotik. Metode za določanje občutljivosti bakterij na antibiotike se delijo na dilucijske in difuzijske (38). Z dilucijskimi metodami dobimo kvantitativne rezultate (MIK), tako dilucijske kot tudi difuzijske metode pa zagotavljajo kvalitativne ocene občutljivosti za antibiotike, ki jih opredelimo s tremi kategorijami: občutljiv (S, angl. susceptible), zmerno oziroma intermediarno občutljiv (I, angl. intermediate) ali odporen (R, angl. resistant) izolat (39). Med rezultati testiranja občutljivosti za antibiotike in uspešnostjo zdravljenja obstaja dobra korelacija (40).

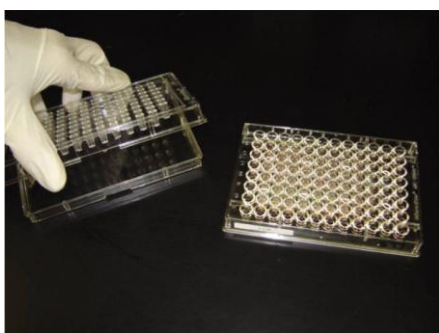
Samo izvedbo testov za določanje občutljivosti in interpretacijo rezultatov za posamezne rodove ali vrste bakterij opredeljujejo mednarodni standardi oziroma smernice. Na ta način je omogočena ponovljivost in primerljivost rezultatov testiranja. Glavni organizaciji, ki te standarde oziroma smernice določata, sta CLSI (Inštitut za klinične in laboratorijske standarde, angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (Evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti, angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Postopek *in vitro* določanja občutljivosti bakterij na antibiotike imenujemo antibiogram, nabor antibiotikov je odvisen od rodu oziroma vrste bakterij in ga prav tako opredeljujejo mednarodni standardi oziroma smernice (41).

1.4.1 DILUCIJSKE METODE

Pri teh metodah govorimo o dilucijskem antibiogramu, ki je kvantitativen preskus občutljivosti na antibiotike, pri katerem lahko uporabljamo trdna (agar dilucijski) ali tekoča gojišča (makrodilucijski in mikrodilucijski antibiogram) z rastočimi koncentracijami antibiotika, ki so običajno dvakratne serijske redčine. Z dilucijskim antibiogramom določimo MIK antibiotika v $\mu\text{g/mL}$, s pomočjo tega podatka pa lahko nadalje izračunamo odmerek antibiotika za uspešno zdravljenje bolnika (42). Koncentracijsko območje, ki ga uporabimo, se razlikuje glede na različne antibiotike, organizem, ki ga testiramo, in mesto okužbe. Vključevati mora koncentracije, ki določajo interpretativne kategorije (S, I, R) in tudi območje, ki vključuje pričakovane MIK kontrolnih sevov (38).

Mikrodilucija

Mikrodilucija v bujonu velja za mednarodno referenčno metodo testiranja občutljivosti, kajti ostale metode, kot je difuzija v agarju z diski, so umerjene po njej (38, 43). Metoda se imenuje 'mikrodilucija', ker vključuje uporabo majhnih volumnov bujona, razdeljenih v sterilnih plastičnih mikrodilucijskih ploščah, ki imajo okrogle luknjice ali luknjice z ravnim dnom, vsaka mora vsebovati 0,1 mL bujona (42). Slika 6 prikazuje mikrotitrsko ploščico za mikrodilucijo (39).



Slika 6: Mikrotitrsko plošča za izvedbo mikrodilucije v bujonu, ki ima 96 luknjic (39).

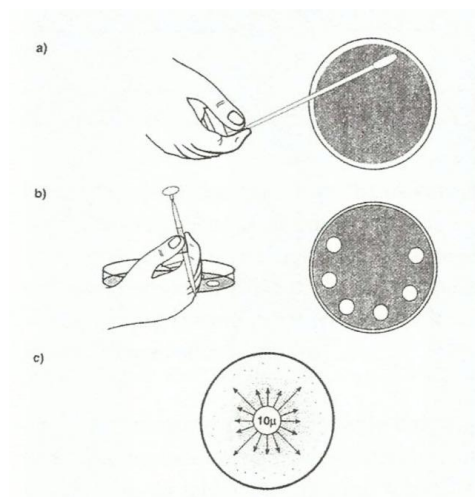
Prednosti te metode pred drugimi so rezultati v obliki MIK, ponovljivost in ekonomičnost zaradi miniaturizacije testa, saj porabimo malo reagentov in prostora (39).

1.4.2 DIFUZIJSKE METODE

Difuzijske metode delimo na disk difuzijske (difuzijski antibiogram) in gradient difuzijske metode.

Difuzijski antibiogram

Difuzijski antibiogram ali difuzija v agarju z diski je preprosta in hitra kvalitativna metoda za določanje občutljivosti na antibiotike pri hitro rastočih bakterijah. Primerno gosto suspenzijo čiste bakterijske kulture zasejemo na površino trdnega gojišča v petrijevki MHA (Mueller Hinton agar) in nanj položimo komercialno pripravljene standardizirane diske, prepojene z določenimi koncentracijami antibiotikov. Slednji difundirajo v gojišče in zavirajo razmnoževanje občutljivih bakterij. Po inkubaciji izmerimo cono zaviralnega pasu okoli diskov (v milimetrih) in izrazimo stopnjo občutljivosti kot S (občutljiv), I (zmerno občutljiv) ali R (neobčutljiv ali odporen). Na sliki 7 vidimo pravilno izdelavo difuzijskega antibiograma (44).



Slika 7: Izdelava difuzijskega antibiograma; a – z brisom zasejemo bakterijski inokulum; b – položimo testne diske; c – antibiotik difundira iz testnega diska v gojišče (44).

Prednosti metode so enostavnost, saj ne zahteva nobene posebne opreme, rezultati, ki jih ni težko interpretirati, fleksibilnost pri izbiri diskov za testiranje in je najcenejša od vseh

2 NAMEN DELA

Piperacilin s tazobaktamom je eden od ključnih antibiotikov za izkustveno in usmerjeno zdravljenje sistemskih in drugih resnih okužb z enterobakterijami, ki izločajo encime ESBL. Pri tovrstnih izolatih pogosto preverjamo občutljivost za piperacilin s tazobaktamom z določitvijo MIK z gradient difuzijsko metodo, saj so težave pri določanju občutljivosti že znane, namreč rezultati, pridobljeni z različnimi metodami, zelo variirajo.

Namen dela je:

1. Opredeliti občutljivost enterobakterij s tremi različnimi metodami po dveh standardih:
 - ~ Opredeliti MIK izbranih sevov za piperacilin s tazobaktamom z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po CLSI in EUCAST.
 - ~ Opredeliti MIK izbranih sevov z disk difuzijsko metodo:
 - z uporabo diskov s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg, interpretirano po CLSI;
 - z uporabo diskov s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg, interpretirano po EUCAST.
 - ~ Opredeliti MIK izbranih sevov z gradient difuzijsko metodo:
 - z uporabo gradient difuzijskega testa bioMérieux Etest[®], interpretiranega po CLSI in EUCAST;
 - z uporabo gradient difuzijskega testa Liofilchem[®] MIC Test Strip, interpretiranega po CLSI in EUCAST.
2. Primerjati rezultate MIK, opredeljene z referenčno metodo mikrodilucije, z rezultati testiranja z disk difuzijsko metodo, interpretirano po CLSI in EUCAST.
3. Primerjati rezultate MIK, opredeljene z referenčno metodo mikrodilucije, z rezultati testiranja MIK, opredeljenih z gradient difuzijskimi testi dveh različnih proizvajalcev, interpretirano po CLSI in EUCAST.
4. Primerjati rezultate MIK, opredeljene z gradient difuzijskima testoma dveh različnih proizvajalcev, interpretiranih po CLSI in EUCAST, med sabo.
5. Opredeliti, katera od metod je najprimernejša za rutinsko opredelitev občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom glede na ustreznost rezultatov.

Hipoteze:

1. Predpostavljamo, da so zgoraj našteje metode ustrezne za določanje občutljivosti izbranih izolatov enterobakterij za antibiotik piperacilin s tazobaktamom.
2. Predpostavljamo, da so te metode primerljive med sabo glede ustreznosti rezultatov.
3. Predpostavljamo, da bo pri teh metodah prišlo do razlike v rezultatih glede na to, kateri standard (CLSI ali EUCAST) bomo uporabili.

3 MATERIALI IN METODE

Pri pripravi gojišč in raztopin smo se opirali na predpise in navodila proizvajalcev, pri izvajanju metod pa na priporočila CLSI in EUCAST.

3.1 BAKTERIJSKI SEVI

Testirali smo občutljivost izolatov kliničnih vzorcev ter referenčnega bakterijskega seva.

3.1.1 IZBIRA BAKTERIJSKIH SEVOV

Za študijo smo izbrali 72 izolatov enterobakterij iz laboratorijske zbirke, shranjenih na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki so jih izolirali v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij (ENT) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) iz nadzornih kužnin bolnikov za presejalno testiranje na prisotnost enterobakterij, ki izločajo encime ESBL. Bolnikom so v času preiskav odvzeli kužnino (blato ali bris rektuma v transportnem gojišču po Amies-u) in jo poslali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo. Kužnino so nacepili na kromogeno gojišče za ESBL (bioMérieux, ChromID ESBL, Marcy l'Étoile, Francija). Bakterije, ki so porasle na gojišču, so identificirali z metodo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Nemčija) in ji določili občutljivost za antibiotike z metodo disk difuzije na Mueller Hinton agarju, prisotnost encimov ESBL so potrdili z metodo s kombiniranimi diski. Test s kombiniranimi diski se izvede tako, da primerjamo velikost zaviralne cone med cefalosporinom in cefalosporinom v kombinaciji s klavulansko kislino. Test je pozitiven, če je premer zaviralne cone okrog kombiniranega diska 5 mm ali več večji od premera zaviralne cone okrog diska z istim cefalosporinom samostojno (47). Izolate so shranili v tubice, napolnjene z mešanico Mueller Hinton bujona in glicerola in zamrznili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Skupno smo analizirali 72 izolatov, od tega 43 izolatov *Escherichia coli*, 24 izolatov *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, 5 izolatov *Enterobacter* spp. (4 izolati *Enterobacter cloacae* in 1 izolat *Enterobacter kobei*). Vsi izolati so bili ESBL pozitivni. Kot referenčni sev, ki omogoča vir oziroma izhodišče za primerjavo s testiranimi izolati, smo uporabili izolat *Escherichia coli* ATCC 25922. Kratica ATCC pomeni American Type

Culture Collection, gre za zasebno neprofitno organizacijo na področju biotehnologije, katere poslanstvo je pridobivanje, avtentikacija, proizvodnja, ohranjanje, razvoj in distribucija standardnih referenčnih mikroorganizmov (48).

3.1.2 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA ZA KULTIVACIJO SEVOV

- ~ Osnovno neselektivno, nediferencialno, trdno krvno gojišče Columbia (Oxoid Microbiology Products, Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA) (Columbia agar).
- ~ Sterilne inokulacijske zanke iz polistirena (modre 10 µl, bele 1 µL), Sarstedt; Nemčija.
- ~ Inkubator Termostat 35 °C, WTB Binder; Nemčija.

3.1.3 KULTIVIRANJE IZOLIRANIH SEVOV

Izbrane zamrznjene izolate smo odtalili in nacepili na gojišče Columbia (Columbia agar, CA) ter inkubirali v aerobni atmosferi 18–24 ur pri 35 ± 2 °C. Seve smo nato še dvakrat precepili (skupno tri precepitve oziroma pasaže na gojišču Columbia in kultivirali v aerobni atmosferi 18–24 ur pri 35 ± 2 °C. Za precepljanje smo uporabljali sveža gojišča Columbia (sestava gojišča je navedena v preglednici III) (49). Šele tretjo pasažo oživljenih sevov smo uporabili za nadaljnje analize.

Preglednica III: Sestava gojišča Columbia (49).

Osnova gojišča	Masa [g]
Posebni pepton	23,0
Škrob	1,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	10,0

Skupno 39,0 g osnovnega medija dodamo 1,0 L destilirane vode in segrevamo do vrenja, da se medij popolnoma raztopi. pH osnovnega medija uravnamo na $7,3 \pm 0,2$ pri 25 °C. Steriliziramo z avtoklaviranjem pri 121 °C 15 minut. Ohladimo na 50 °C in dodamo 5 %

sterilne defibrinirane krvi. Tako pripravljeno gojišče razdelimo v sterilne petrijevke in hranimo v hladilniku pri 2–8 °C (49).

3.2 MIKRODILUCIJSKA METODA DOLOČANJA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ANTIBIOTIKA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM

Za določitev *in vitro* občutljivosti izbranih enterobakterij na antibiotik z referenčno mikrodilucijsko metodo smo določili MIK antibiotika piperacilin s tazobaktamom. Najprej smo pripravili načrt, po katerem smo kasneje delali. Glede na izbrano referenčno metodo smo preračunali, koliko raztopine posamezne koncentracije antibiotika moramo vnaprej pripraviti, da bomo lahko izvedli poizkus na vseh 72 vzorcih, upoštevajoč za vsako koncentracijo tri vzporedne ponovitve, morebitne naknadne ponovitve zaradi kontaminacije ali nepričakovanih rezultatov. Sledil je izračun približnih količin vseh koncentracij antibiotika, ki jih bomo porabili v enem delovnem dnevu in njihovo porazdelitev v sterilne krio tubice, v katerih bomo raztopine zamrznili do uporabe. Zaradi časovnih in praktičnih zmožnosti smo se poslužili vnaprejšnje priprave in zamrzovanja raztopin antibiotika ob predpostavki, da enkratna zamrznitev na –80 °C in odmrznitev ne bo vplivala na stabilnost antibiotika, ki se lahko pri temperaturah, nižjih od –60 °C shranjuje do šest mesecev (50). Potrebna je bila še sterilizacija vseh vsebnikov in pripomočkov, ki bodo prišli v stik s kulturami in raztopinami. Pogoji sterilizacije: avtoklaviranje (para, segreta na 121–134 °C 15 min pri 100 kPa), sterilizacija s suho toploto (vroči zrak, 2 uri na 160 °C).

3.2.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA

- ~ Sterilne mikrotitrne plošče za gojenje celičnih kultur s 96 vdolbinami (cellGradeTM, BRAND plates[®], BRAND; Nemčija).
- ~ Pipete 0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL (Eppendorf Research[®] plus; Hamburg, Nemčija).

- ~ Plastični nastavki za pipete, ki smo jih pred uporabo sterilizirali z avtoklaviranjem (vlažna sterilizacija) pri 121 °C 15 minut (Biohit Optifit Tip Bulk 300 µL, Sartorius; Goettingen, Nemčija in epT.I.P.S.[®] Standard, Eppendorf Quality[™], 0.1–10 µL ter epT.I.P.S.[®] Standard, Eppendorf Quality[™], 50–1000 µL; Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija).
- ~ Sterilni membranski filtri 0,2 µm (Minisart[®] syringe filters; Sartorius, Goettingen, Nemčija).
- ~ Inkubator Termostat 35 °C, WTB Binder; Nemčija.
- ~ Gorilnik.
- ~ Epruvete s po 5,0 mL sterilne fiziološke raztopine.
- ~ Sterilne bombažne vatirane palčke.
- ~ Sterilne hokejke.
- ~ Zamrzovalnik –80 °C (Sanyo Electric Co., Ltd.; Japonska).
- ~ Sterilne krio tubice za zamrzovanje pri nizkih temperaturah iz polipropilena, prostornina 2,0 mL (TPP; Trasadingen, Švica).
- ~ Nefelometer (BBL[™] CrystalSpec[™] Nephelometer; Becton Dickinson and Company, ZDA).
- ~ Vorteks mešalo (Fisherbrand* ZX Wizard vortex mixer with infrared sensor; Thermo Fisher Scientific Inc.; ZDA).
- ~ Pipete 10,0 in 20,0 mL (TPP; Trasadingen, Švica).
- ~ Elektronska analitska tehnica (Sartorius; Goettingen, Nemčija).
- ~ Mueller Hintonov bujon s prilagojeno koncentracijo kationov [CAMHB: Cation Adjusted Mueller Hinton Bujon; Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted), BBL[™]; Becton Dickinson and Company, ZDA].

3.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN ANTIBIOTIKA

Za našo študijo smo izbrali antibiotik piperacilin v kombinaciji z zaviralcem betalaktamaz tazobaktamom. Koncentracijski interval antibiotika piperacilina smo izbrali s pomočjo literature glede na število dilucij oziroma načrt postavitve mikrotitrne plošče (50). Interval smo razdelili na dvanajst koncentracij, ki rastejo s faktorjem 2 in tako dobili dvanajst serijskih razredčin antibiotika. Upoštevali smo vsebnost čistega antibiotika v prašku.

Koncentracija zaviralca betalaktamaz tazobaktama je bila nespremenjena, ne glede na koncentracijo piperacilina, 4 µg/mL.

Uporabljeni antibiotiki in topila:

- ~ Piperacilin (piperacillin sodium, Na-sol, bel do umazano bel prašek, Sigma–Aldrich, St. Louis, ZDA).
- ~ Tazobaktam (tazobactam sodium, Na-sol, bel prašek, Sigma–Aldrich, St. Louis, ZDA).
- ~ Destilirana voda.

Da bi izhodne koncentracije antibiotika v vdolbinicah mikrotitrskih plošč ustrezale zahtevanim koncentracijam, smo pri izračunu za pripravo izhodnih antibiotičnih raztopin upoštevali končni volumen inokuluma po dodatku antibiotika: 50 µL inokuluma + 50 µL antibiotične raztopine = 100 µL.

Koncentracije antibiotika v izhodnih raztopinah smo izračunali po enačbi 1:

$$n = c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2 \Rightarrow c_1 = c_2 \times \frac{V_2}{V_1} \quad (\text{enačba 1})$$

c1: izhodna koncentracija raztopine antibiotika

V1: volumen raztopine antibiotika = 50 µL

c2: končna, zahtevana koncentracija antibiotika po dodatku v inokulum

V2: končni volumen inokuluma po dodatku raztopine antibiotika = 100 µL

Izračunane izhodne koncentracije antibiotika (c1), ki smo jih pripravili (serijske dvakratne razredčine):

Piperacilin s tazobaktamom: 0,25/8–512/8 µg/mL

Serijske razredčine [$\mu\text{g/mL}$]: 0,25/8; 0,5/8; 1/8; 2/8; 4/8; 8/8; 16/8; 32/8; 64/8; 128/8; 256/8; 512/8

Koncentracijski interval in zahtevane koncentracije antibiotika (c2) v vdolbinicah mikrotitrskih plošč:

Piperacilin s tazobaktamom: 0,125/4–256/4 $\mu\text{g/mL}$

Serijske razredčine [$\mu\text{g/mL}$]: 0,125/4; 0,25/4; 0,5/4; 1/4; 2/4; 4/4; 8/4; 16/4; 32/4; 64/4; 128/4; 256/4

V seriji raztopin antibiotika zahtevane koncentracije naraščajo s faktorjem 2, zato bi lahko naraščajoče koncentracije antibiotika pripravljali z razredčevanjem višjih na polovico, začenši z najvišjo koncentracijo antibiotika. Ker pa smo imeli poleg antibiotika piperacilina še zaviralec betalaktamaz tazobaktam, katerega koncentracija mora biti ves čas 4 $\mu\text{g/mL}$, smo vnaprej pripravili vse koncentracije piperacilina s tazobaktamom (22).

Raztopine antibiotika piperacilin s tazobaktamom smo pripravili po navodilih proizvajalca. Kot topilo smo uporabili destilirano vodo. Nadaljnje redčenje pri pripravi serijskih raztopin antibiotika smo izvajali z Mueller Hintonovim bujonom s prilagojeno koncentracijo kationov (CAMHB, angl. Cation Adjusted Mueller Hinton Bujon). Celotno pripravo raztopin smo izvajali ob gorilniku. Najprej smo pripravili stokrat večji količini tazobaktama in piperacilina, da bi se izognili eksperimentalni napaki zaradi majhnih količin. Začetna koncentracija tazobaktama za vse serijske razredčine je bila 16 $\mu\text{g/mL}$, ker smo jo redčili z ustreznimi koncentracijami piperacilina, ki so bile ravno tako višje za faktor 2, tako da smo na koncu dobili izračunane koncentracije dvanajstih serijskih razredčin, primernih za dvakratno redčenje s kulturo. Pripravljene raztopine smo sterilizirali z mikrofiltracijo skozi sterilne membranske filtre z velikostjo por 0,2 μm , jih porazdelili v sterilne 2,0 mL krio tubice, katere smo ustrezno označili glede na koncentracijo. Do uporabe smo jih shranili v zamrzovalniku pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo jih vedno sproti odmrznili in počakali, da je raztopina dosegla sobno temperaturo (42).

3.2.3 PRIPRAVA INOKULUMA

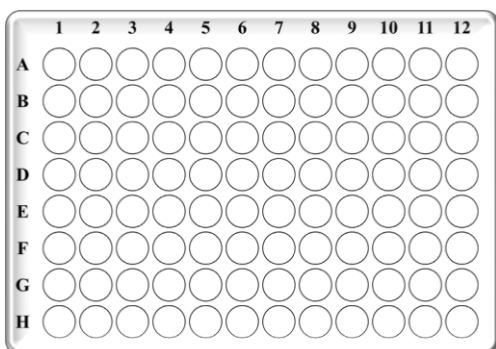
Bakterijsko suspenzijo za izdelavo antibiograma smo pripravili neposredno pred izvedbo antibiograma. Za pripravo začetne suspenzije celic, ki ustreza standardu 0,5 po McFarlandovi lestvici, smo s pomočjo sterilne vatirane palčke prenesli 3 do 5 kolonij iz 18–24 urne kulture na gojišču Columbia v epruveto z 2,5 mL CAMHB. Homogenost smo zagotovili z mešanjem na vorteks mešalu 15–20 sekund. Tako smo z nefelometrom pripravili začetno suspenzijo celic s standardom 0,5 po McFarlandu, kar ustreza koncentraciji $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/mL (CFU – enota, kolonijsko število, angl. colony forming units). Da smo dosegli to željeno koncentracijo, smo kulturo po potrebi redčili s CAMHB. Ko smo začetni inokulum pripravili, smo ga morali porabiti v 15 minutah (50).

Začetni standardiziran inokulum smo redčili s CAMHB, tako da smo dobili koncentracijo 5×10^5 CFU/mL, kar je ekvivalentno 5×10^4 CFU/vdolbinico (upoštevali smo volumen napolnjene vdolbinice 100 μ L). Ker smo inokulirali 50 μ L kulture, smo začetno suspenzijo redčili v razmerju 1:100, in sicer tako, da smo vzeli 25 μ L začetne suspenzije in jo redčili v 2500 μ L CAMHB. Nova suspenzija je tako imela koncentracijo 1×10^6 CFU/mL, tako da je bila absolutna količina inokuliranih bakterij v vdolbinici s 50 μ L suspenzije 5×10^4 CFU/mL, kot je potrebno.

Kontrola inokuluma: za vsako od treh ponovitev vsakega seva smo iz vdolbinice mikrotitrne plošče s pozitivno kontrolo vzeli 5,0 μ L in jih prenesli v 5,0 mL sterilne fiziološke raztopine (redčitev 1:1000), premešali na vorteks mešalu ter 100 μ L te redčitve nanesti na gojišče Columbia. Po inkubaciji pri 35 ± 2 °C za 16–20 ur mora za pravilni inokulum zrasti približno 50 kolonij, kar kaže na gostoto inokuluma 5×10^5 CFU/mL (42).

3.2.4 IZVEDBA MIKRODILUCIJSKEGA ANTIBIOGRAMA

Izvedba mikrodilucijskega antibiograma poteka na mikrotitrskih ploščah. To so prozorne sterilne plošče iz umetne mase s 96 vdolbinicami z ravnim dnom, razdeljenimi v označene vrstice in stolpce, zraven sodi še pokrov. Slika 9 prikazuje mikrotitrsko ploščo z osmimi vrsticami in dvanajstimi stolpci, kakršne smo uporabljali tekom naše študije. V preglednici IV pa je prikazan načrt nanašanja v mikrotitrne plošče.



Slika 9: Model mikrotitrne plošče, ki smo jo uporabljali pri naši raziskavi.

Preglednica IV: Načrt priprave mikrotitrskih plošč za antibiogram.

	Protokol/ Številka	1 256/4	2 128/4	3 64/4	4 32/4	5 16/4	6 8/4	7 4/4	8 2/4	9 1/4	10 0,5/4	11 0,25/4	12 0,125/4
A	Sev 1 - 1.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
B	Sev 1 - 2.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
C	Sev 1 - 3.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
D	NK	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
E	PK	Sev 1	Sev 1	Sev 1	/	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	/	Sev2	Sev 2	Sev 2
F	Sev 2 - 1.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
G	Sev 2 - 2.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8
H	Sev 2 - 3.	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8	0,25/8

Vrstice:

A–C: tri ponovitve enega seva za izbrani antibiotik

D: negativna kontrola (NK): 50 μ L CAMHB + 50 μ L ustrezne koncentracije antibiotika

E: pozitivna kontrola (PK): 100 μ L inokuluma brez antibiotika (vdolbinice E1–E3 ter E10–E12) in kontrola nekontaminiranosti CAMHB: 100 μ L CAMHB (vdolbinice E5–E8)

F–H: tri ponovitve drugega seva za izbrani antibiotik

Stolpci:

1: pripravljen inokulum (50 μ L) + raztopina antibiotika najvišje koncentracije (50 μ L)

2: pripravljen inokulum (50 μ L) + raztopina antibiotika druge najvišje koncentracije (50 μ L) ...

12: pripravljen inokulum (50 μ L) + raztopina antibiotika najnižje koncentracije (50 μ L)

Na mikrotitrsko ploščo smo najprej nanesli po 50 μ L sterilnega CAMHB v vrstico D ter po 100 μ L CAMHB v vdolbinice E5–E8 za preverjanje sterilnosti CAMHB. Nadalje smo nanašali po 50 μ L antibiotika, in sicer v vrstice A–D ter F–H, kjer smo v vsak stolpec nanesli ustrezno koncentracijo antibiotika, kjer je bila v stolpcu 1 najvišja koncentracija in v stolpcu 12 najnižja. Vsakič smo tudi zamenjali nastavek za pipeto, da ne bi prišlo do prenosa višje koncentracije k nižji. Vrstice A–C in F–H smo inokulirali s po 50 μ L bakterijske suspenzije, ki smo jo nanašali v obratni smeri od koncentracij antibiotika (od stolpca 12 proti stolpcu 1), da ni prišlo do prenosa antibiotika (50). Za vsako ponovitev smo nanesli še 100 μ L inokuluma za pozitivno kontrolo v vdolbinice E1–E3 ter E10–E12. Ker smo delali tri ponovitve za vsak sev, smo na vsaki plošči lahko preizkusili dva seva. Plošče smo pokrili, da bi preprečili izhlapevanje bujona med inkubacijo. Inkubirali smo jih v termostatu v aerobni atmosferi pri temperaturi 35 ± 2 °C. Po 16–20 urah smo s pomočjo temne podlage, na katero smo postavili mikrodilucijsko ploščo, določevali MIK.

Kontrola kakovosti: Vsakič smo testirali tudi referenčni sev *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, za katerega so mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij antibiotika piperacilin s tazobaktamom 1/4 – 4/4 μ g/mL (47). S tem smo zagotovili pravilno izvajanje metode in ponovljivost rezultatov.

3.2.5 DOLOČEVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ANTIBIOTIKA

MIK smo določevali z vizualnim ocenjevanjem mikrotitrskih plošč na temni podlagi. Plošče smo brali od najnižje koncentracije proti najvišji za vsak sev posebej. Ocenjevali smo motnost vdolbinic, ki smo jih primerjali s pozitivno kontrolo. MIK smo definirali kot najnižjo koncentracijo antibiotika, ki popolnoma prepreči rast bakterij v vdolbinici, to je prva vdolbinica brez motnosti (46). Kot MIK vrednost smo podali koncentracijo antibiotika, ki je bila enaka v vseh treh ponovitvah istega seva. V primeru, da pri treh ponovitvah istega seva nismo dobili enakih MIK vrednosti, smo ponovili testiranje seva.

3.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE Z METODO DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI

Za primerjavo rezultatov z našo referenčno metodo mikrodilucije smo istočasno z mikrodilucijo delali še disk difuzijske antibiogramne, ki so veliko preprostejši in hitrejši za uporabo. Metodo disk difuzijskega antibiograma smo uporabili za semikvantitativno *in vitro* testiranje občutljivosti izbranih sevov z dvema različnima diskoma po dveh standardih – CLSI in EUCAST.

3.3.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA

- ~ Merilo za merjenje premera inhibicijskih con v milimetrih.
- ~ Inkubator Termostat 35 °C, WTB Binder; Nemčija.
- ~ Sterilne bombažne vatirane palčke.
- ~ Vrtljiva mizica (*Retro C80TM*; *AB Biodisk*, Švedska).
- ~ Mueller Hinton agar (MHA: Mueller Hinton II Agar (Cation-Adjusted), BBL™; Becton Dickinson and Company, ZDA).
- ~ Hladilno zamrzovalna omara Liebherr MediLine (od -20 °C do +4 °C); Liebherr-International Deutschland GmbH, Nemčija.
- ~ Standardizirani diski s koncentracijo antibiotika piperacilin s tazobaktamom 110 µg (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs Piperacillin/Tazobactam 100/10 µg; Becton Dickinson and Company, ZDA).
- ~ Standardizirani diski s koncentracijo antibiotika piperacilin s tazobaktamom 36 µg (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs Piperacillin/Tazobactam 30/6 µg; Becton Dickinson and Company, ZDA).
- ~ Sterilna pinceta.

3.3.2 IZVEDBA METODE DIFUZIJE V AGARJU Z DISKI

Izvedba metode difuzije v agarju z diski poteka v petrijevkah, napolnjenih z MHA, debeline 4 mm. MHA je priporočeno gojišče za testiranje občutljivosti bakterij na

antibiotike z metodo difuzije v agarju z diski (51, 52). Sestava gojišča MHA je podana v preglednici V (53).

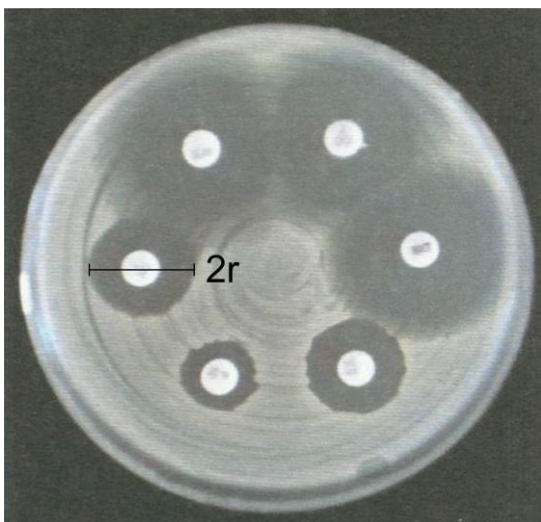
Preglednica V: Sestava gojišča Mueller Hinton II agar (MHA) (53).

Sestavine	Masa [g]
Goveji ekstrakt	2,0
Kisli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Za pripravo gojišča MHA smo v 1,0 L destilirane vode dodali 38,0 g zgornje mešanice in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Gojišče smo nalili v sterilne petrijevke in pustili ohladiti na sobno temperaturo. Shranili smo jih v hladilnik pri temperaturi 2–8 °C in porabili v sedmih dneh.

Za izdelavo antibiogramov smo uporabili osnovni inokulum gostote 0,5 McFarlanda, ki smo ga pripravili z direktno metodo (na enak način kot je opisano v poglavju 3.2.3 Priprava inokuluma). Sterilno bombažno palčko smo pomočili v inokulum gostote 0,5 McFarlanda, jo otrli ob notranji rob epruvete, da smo iztisnili odvečno tekočino ter s pomočjo vrtljive mizice enakomerno nanесли inokulum na celotno površino petrijevke z MHA. Preden smo položili antibiotične diske, smo počakali 3–5 minut, da je gojišče absorbiralo morebitno odvečno tekočino, vendar ne več kot 15 minut. Diske smo vedno polagali tako, da so bile sredine diskov vsaj 24 milimetrov narazen. Na isto ploščo smo položili dva diska, in sicer disk s koncentracijo antibiotika piperacilin/tazobaktam 30/6 µg in 100/10µg. Ker nismo uporabljali avtomatskega polagalca diskov, smo si pomagali s sterilno pinceto, da smo zagotovili enakomeren stik diska s površino. Inokulirane antibiogramne smo inkubirali obrnjene navzgor v aerobni atmosferi 16–18 ur pri 35 ± 2 °C (54).

Pri pravilni inokulaciji plošč so zaviralne cone enakomerne in okrogle, bakterijska rast pa enakomerno zraščena. S pomočjo merila smo izmerili premere con popolne inhibicije do najbližjega celega milimetra, tako da smo upoštevali tudi premer samega diska, ki znaša 6 milimetrov (51). Slika 10 prikazuje pravilno merjenje različnih zaviralnih con (55).



Slika 10: Difuzijski antibiogram, merjenje premera zaviralnih con ob diskih z antibiotiki (55).

Izmerjene vrednosti smo primerjali s standardnimi vrednostmi, ki so predpisane za antibiotik, in sicer: vrednosti, ki smo jih izmerili pri diskih s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 μg , smo interpretirali po kriterijih EUCAST, vrednosti, ki smo jih dobili z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 μg pa po kriterijih CLSI. Rezultate smo interpretirali kot občutljiv (S), zmerno občutljiv (I) ali odporen (R).

3.4 GRADIENT DIFUZIJSKA METODA ZA DOLOČANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ANTIBIOTIKA

Določanje občutljivosti z gradient difuzijskimi testi predstavlja kombinacijo dilucijskega in difuzijskega antibiograma, kjer odčitamo MIK na trdnem gojišču. Gradient difuzijski testi so zelo tanke membrane oziroma trakovi (plastični ali papirnati, odvisno od proizvajalca), impregnirani s 15 padajočimi koncentracijami antibiotika (55). Sočasno z mikrodilucijo na mikrotitrski plošči ter z disk difuzijsko metodo smo naredili še gradient difuzijska testa (Liofilchem[®] MIC Test Strip in bioMérieux Etest[®]) – želeli smo primerjati njuno občutljivost glede na referenčno metodo mikrodilucije. Rezultate testa smo primerjali z rezultati iz laboratorijske zbirke podatkov, iz katere je bilo razvidno, da dajeta testa

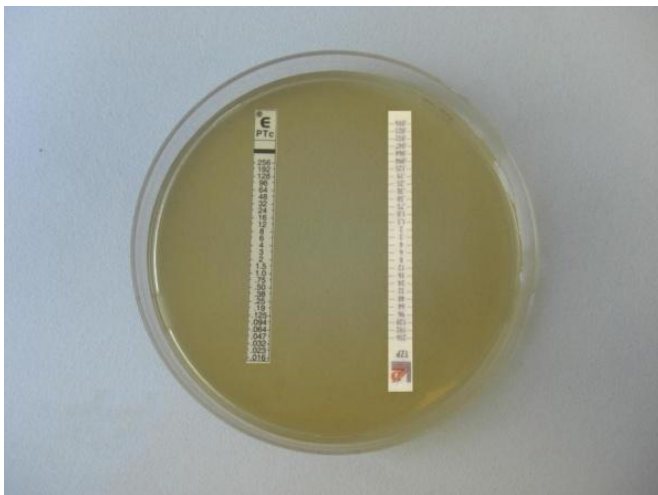
različne rezultate, zato je bilo potrebno določiti, kateri daje primerljive, saj je razlika v ceni med obema velika.

3.4.1 TEHNIČNI PRIPOMOČKI IN OPREMA

- ~ Sterilna pinceta.
- ~ Sterilne bombažne vatirane palčke.
- ~ Vrtljiva mizica (*Retro C80TM*; *AB Biodisk*, Švedska).
- ~ Mueller Hinton agar (MHA: Mueller Hinton II Agar (Cation-Adjusted), BBL™; Becton Dickinson and Company, ZDA).
- ~ MIC Test Strip for antimicrobial susceptibility testing LD (Liofilchem Diagnostici); PIP*/TAZO 0,016–256* mg/L, 100 testov, pakiranih po 10 (Liofilchem®), Italija).
- ~ Etest® PIP*/TAZO 0,016–256* µg/mL (bioMérieux SA, Francija).
- ~ Inkubator Termostat 35 °C, WTB Binder; Nemčija.
- ~ Hladilno zamrzovalna omara Liebherr MediLine (–20 °C do +4 °C); Liebherr-International Deutschland GmbH, Nemčija.

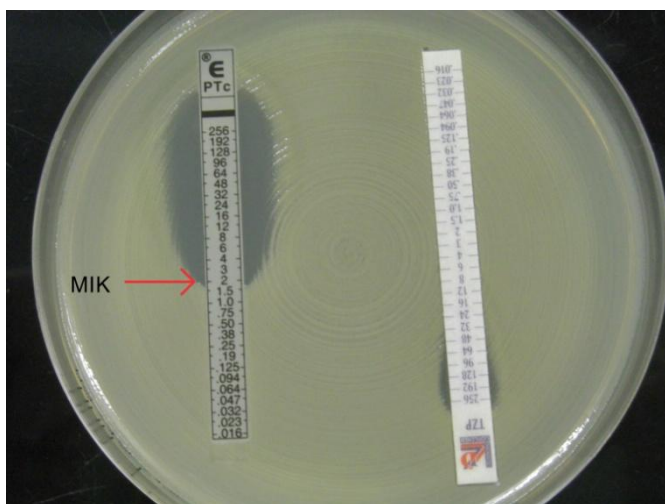
3.4.2 IZVEDBA GRADIENT DIFUZIJSKIH TESTOV

Za gradient difuzijske teste smo uporabili MHA (petrijevke premera 9 cm). Bakterijski inokulum smo pripravili na enak način kot za difuzijo v agarju z diski (poglavje 3.3.2 Izvedba metode difuzije v agarju z diski). S sterilno pinceto smo položili oba gradient difuzijska testa (Liofilchem® MIC Test Strip in bioMérieux Etest®) na površino MHA tako, da sta bila obrnjena v nasprotnih smereh, da se zaviralni elipsi ne bi prekrivali. Pri tem smo morali paziti, da je bil vsak trak v celoti v stiku z gojiščem. Zračne mehurčke, ki so se pojavili med trakom in gojiščem, smo sprostili z rahlim potegom pincete od nižje proti višji koncentraciji antibiotika, pri čemer smo pazili, da traku nismo premaknili. Ko smo gradient difuzijska testa enkrat položili, ju nismo smeli več premikati, saj pride do takojšnje difuzije antibiotika v gojišče. Način polaganja trakov prikazuje slika 11.



Slika 11: Način polaganja gradient difuzijskih testov na Mueller Hinton agar v petrijevki.

Plošče smo inkubirali v aerobni atmosferi 16–20 ur pri 35 ± 2 °C. Po končani inkubaciji smo odčitali MIK vrednosti pri tisti koncentraciji antibiotika, pri kateri je zaviralna elipsa sekala trak gradient difuzijskega testa. Če je zaviralna elipsa sekala trak med dvema koncentracijama, smo rezultat zaokrožili navzgor (56). Pri interpretaciji vrednosti MIK smo upoštevali kriterije za interpretacijo po EUCAST in CLSI, ki so enaki kot za dilucijski antibiogram. Slika 12 prikazuje pravilno odčitavanje minimalne inhibitorne koncentracije.



Slika 12: Primer pravilnega odčitavanja minimalne inhibitorne koncentracije, ki je tista vrednost koncentracije antibiotika, pri kateri zaviralna elipsa seka trak gradient difuzijskega testa.

Kontrola metode gradient difuzijskih testov: za kontrolo metode smo uporabili referenčni sev s poznano MIK vrednostjo za izbrani antibiotik *Escherichia coli* ATCC® 25922. Rezultate testiranja občutljivosti kontrolnega seva prikazuje preglednica VI.

Preglednica VI: Rezultati testiranja občutljivosti referenčnega seva *Escherichia coli* in interpretacija rezultatov po standardih EUCAST in CLSI.

<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 / datum testiranja	MIK Etest® bioMérieux [µg/mL]	Interpretacija EUCAST	Interpretacija CLSI	MIK gradient difuzijskega testa Liofilchem [µg/mL]	Interpretacija EUCAST	Interpretacija CLSI
18.12.2013	2	S	S	4	S	S

ATCC – American Type Culture Collection, MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), S – občutljiv

Vse vrednosti so v območju dovoljenega razpona vrednosti MIK, namreč za *Escherichia coli* ATCC® 25922 so mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij antibiotika piperacilin s tazobaktamom 1/4–4/4 µg/mL (47).

3.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

Stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata izrazimo kot:

- ~ občutljiv (S, angl. sensitive): z običajnim odmerkom antibiotika dosežemo za bakterijo inhibitorno koncentracijo zdravila v krvi;
- ~ zmerno občutljiv (I, angl. intermediate): odmerek zdravila določimo (povečamo) glede na mesto okužbe in MIK;
- ~ neobčutljiv ali odporen (R, angl. resistant): zdravilo ni primerno za zdravljenje (55).

Rezultate smo interpretirali po dveh kriterijih, CLSI in EUCAST. Rezultate testiranja z metodo difuzije v agarju z diski in gradient difuzijsko metodo smo primerjali z rezultati referenčne mikrodilucijske metode določanja MIK in ovrednotili napake kot 1) majhna napaka, 2) velika napaka in 3) zelo velika napaka.

Majhna napaka (angl. minor error) je odstopanje med rezultati referenčne mikrodilucijske metode in testne metode za eno kategorijo (S/I ali I/R).

Velika napaka (angl. major error) je opredeljena kot izolat, ki je občutljiv (S) za piperacilin s tazobaktamom z referenčno mikrodilucijsko metodo in odporen (R) s testno metodo.

Zelo velika napaka (angl. very major error) je opredeljena kot izolat, ki je odporen (R) proti piperacilinu s tazobaktamom z referenčno mikrodilucijsko metodo in občutljiv (S) s testno metodo (57).

3.5.1 STANDARD CLSI

Interpretativni kriterij za metodo difuzije v agarju z diski po CLSI velja za diske s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 100/10 µg. Interpretativni kriterij MIK pa velja tako za metodo mikrodilucije kot za gradient difuzijsko metodo za določanje MIK vrednosti antibiotika. Preglednica VII prikazuje interpretativne kriterije po CLSI za premere zaviralnih con in MIK (47).

Preglednica VII: Interpretativni kriteriji zaviralnih con in minimalnih inhibitornih koncentracij po CLSI (47).

Antibiotik	Vsebnost diska	Interpretativni kriterij premera cone (najbližji cel milimeter)			Interpretativni kriterij MIK [µg/mL]		
		S	I	R	S	I	R
Piperacilin/ tazobaktam	100/10 µg	≥ 21	18–20	≤ 17	≤ 16/4	32/4–64/4	≥ 128/4

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen

3.5.2 STANDARD EUCAST

EUCAST interpretativni kriterij se od CLSI kriterija razlikuje v tem, da velja za diske s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 30/6 µg in pa v mejnih vrednostih. Preglednica VIII prikazuje interpretativne kriterije po EUCAST (52).

Preglednica VIII: Interpretativni kriteriji zaviralnih con in minimalnih inhibitornih koncentracij po EUCAST (52).

Antibiotik	Vsebnost diska	Mejne vrednosti premera cone [mm]			Mejne vrednosti MIK [mg/L]		
		S	I	R	S	I	R
Piperacilin/tazobaktam	30/6 µg	≥ 20	17–19	< 17	≤ 8/4	16/4	> 16/4

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen

Smernice EUCAST so v Sloveniji v uporabi v kliničnih mikrobioloških laboratorijih od aprila 2014.

3.5.3 STATISTIČNA ANALIZA

Statistično analizo smo naredili s pomočjo χ^2 testa neodvisnosti in Cohenovim koeficientom kappa (κ).

χ^2 test neodvisnosti

Za statistično primerjavo občutljivosti vseh metod smo uporabili kontingenčne tabele za izvedbo χ^2 testa neodvisnosti. Ta neparametrični test upošteva nominalne spremenljivke z več kategorijami, v primerjavi s parametričnimi testi pa ima manjšo moč. Za uporabo χ^2 testa smo se odločili zato, ker smo imeli neodvisne podatke opazovanja in ker se je vsaka vrednost podatkov štela samo v eni kategoriji (S, I ali R), kar je tudi pogoj za uporabo tega testa. Potrebno je tudi predpostavljati, da je število opazovanj fiksno. Za statistično mejo pomembnosti smo določili p-vrednost 0,05 (58, 59).

Cohenov koeficient kappa

Zanesljivost metod smo ovrednotili tudi s Cohenovim koeficientom kappa tako, da smo rezultate interpretacije S, I in R, pridobljene s testno metodo, primerjali z rezultati referenčne metode. Posebej smo analizirali še skladnost ločevanja občutljivih izolatov (kategorija S) od izolatov, ki niso občutljivi (združeni kategoriji I in R). Ujemanja in neujemanja smo nato s Cohenovim koeficientom kappa ovrednotili kot zanesljivost testiranih metod.

Cohenov koeficient kappa je statistično merilo za ugotavljanje, v kolikšni meri se dva različna ocenjevalna sistema strinjata o dodelitvi kategoričnih spremenljivk. Kappa vrednosti segajo od 0 do 1 (čeprav so možne tudi negativne vrednosti), kjer višje številke pomenijo večjo zanesljivost, vrednosti blizu ničle ali negativne vrednosti pa zgolj naključje (60). Preglednica IX prikazuje interpretacijo rezultatov Kappa (61, 62).

Preglednica IX: Interpretacija rezultatov zanesljivosti (61, 62).

Kappa (κ)	Interpretacija
< 0	Slaba zanesljivost
0.00–0.20	Rahla zanesljivost
0.21–0.40	Dokajšnja zanesljivost
0.41–0.60	Zmerna zanesljivost
0.61–0.80	Znatna/dobra zanesljivost
0.81–1.00	Skoraj popolna/zelo dobra zanesljivost

4 REZULTATI

Izhajajoč iz namena dela, katerega cilj je bil opredeliti občutljivost enterobakterij s tremi različnimi metodami po dveh standardih, primerjati rezultate MIK, opredeljene s tremi različnimi metodami, med sabo ter opredeliti, katera od metod je najprimernejša za rutinsko opredelitev občutljivosti, smo dobili rezultate, ki so prikazani v nadaljevanju.

4.1 OPREDELITEV OBČUTLJIVOSTI ENTEROBAKTERIJ S TREMI RAZLIČNIMI METODAMI GLEDE NA SMERNICI CLSI IN EUCAST

Preglednica X prikazuje občutljivost vseh 72 sevov s tremi različnimi metodami (mikrodilucija, disk difuzija in gradient difuzija), interpretiranih po dveh različnih smernicah (CLSI in EUCAST).

Preglednica X: Občutljivost vseh 72 sevov enterobakterij.

Št. izolata	Metoda Izolot	Mikrodilucija (referenčna metoda)		Disk difuzija		Gradient difuzija			
		CLSI	EUCAST	100/10 µg	30/6 µg	Biomerieux		Liofilchem	
				CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
1	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
2	<i>E. coli</i>	S	I	S	I	S	S	S	I
3	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
4	<i>E. coli</i>	S	I	S	S	S	S	S	S
5	<i>E. coli</i>	S	S	S	I	S	S	S	I
6	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
7	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
8	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
9	<i>E. coli</i>	S	I	S	I	S	S	S	I
10	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	S	R	R
11	<i>E. coli</i>	I	R	I	R	S	S	I	R
12	<i>E. coli</i>	S	I	S	I	S	S	S	I
13	<i>E. coli</i>	R	R	I	I	S	S	I	R
14	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
15	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
16	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
17	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
18	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
19	<i>E. coli</i>	R	R	S	I	S	S	I	R
20	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	I	R	R	R
21	<i>E. coli</i>	S	I	S	S	S	S	I	R
22	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
23	<i>E. coli</i>	R	R	I	I	S	S	R	R
24	<i>E. coli</i>	R	R	I	I	S	S	I	R
25	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
26	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
27	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
28	<i>E. coli</i>	I	R	S	I	S	S	S	I
29	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R

30	<i>E. coli</i>	I	R	S	I	S	S	S	I
31	<i>E. coli</i>	S	I	S	I	S	S	S	I
32	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
33	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	S	I	R	R
34	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	I
35	<i>E. coli</i>	I	R	S	S	S	S	R	R
36	<i>E. coli</i>	S	I	S	S	S	S	S	I
37	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
38	<i>E. coli</i>	I	R	I	R	S	I	I	R
39	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
40	<i>E. coli</i>	R	R	I	R	I	R	R	R
41	<i>E. coli</i>	I	R	I	I	S	I	I	R
42	<i>E. coli</i>	R	R	I	I	S	I	I	R
43	<i>E. coli</i>	I	R	S	I	S	S	I	R
44	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
45	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
46	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	I	S	S	I	R
47	<i>K. pneumoniae</i>	S	I	I	R	S	I	I	R
48	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	I	I	S	S	S	I
49	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
50	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
51	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
52	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	R	S	S	S	I
53	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
54	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	R	S	S	S	I
55	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
56	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	S	I	R	R
57	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	I	I	S	S	S	I
58	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
59	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
60	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	I	S	S	S	S
61	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
62	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
63	<i>K. pneumoniae</i>	I	R	I	I	S	S	I	R
64	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	R	I	R	R	R
65	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	I	I	S	I	I	R
66	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
67	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
68	<i>E. cloacae</i>	R	R	I	R	I	R	I	R
69	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
70	<i>E. cloacae</i>	I	R	I	R	S	I	R	R
71	<i>E. cloacae</i>	S	I	I	I	S	S	S	I
72	<i>E. kobei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen

4.1.1 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z REFERENČNO METODO MIKRODILUCIJE

Z referenčno metodo mikrodilucije na mikrotitrski plošči smo testirali 72 izolatov enterobakterij, ki izločajo encime ESBL, in jim določili MIK. Dobljene rezultate smo interpretirali po dveh smernicah, CLSI in EUCAST, kar prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Primerjava razporeditve občutljivosti enterobakterij pri mikrodiluciji glede na CLSI in EUCAST.

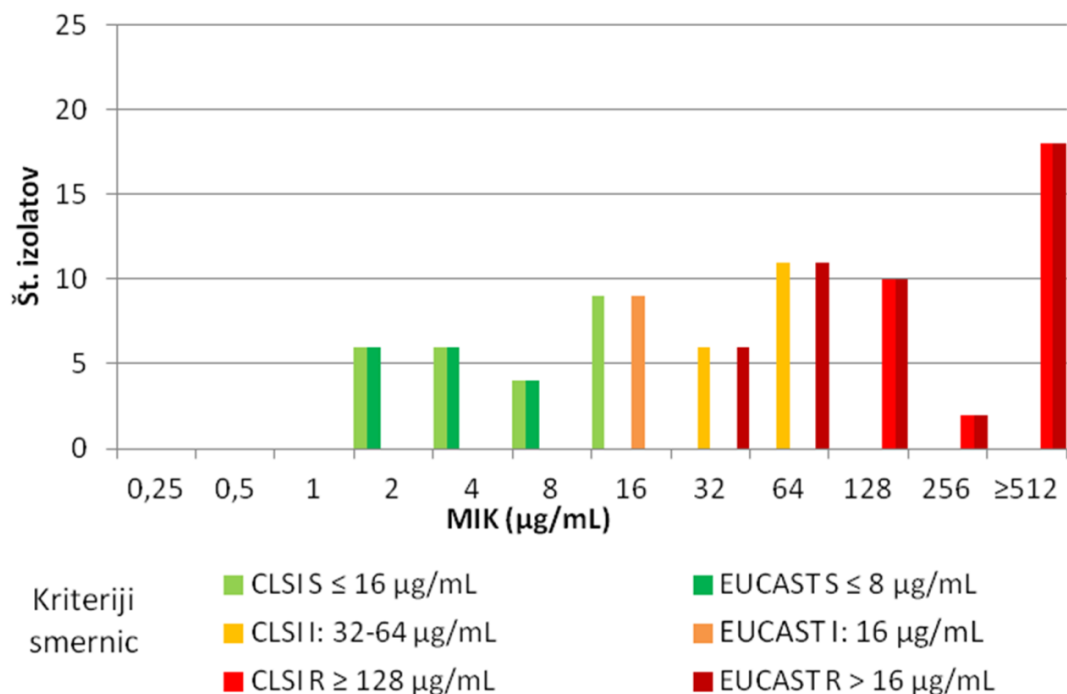
Smernica Občutljivost	CLSI	EUCAST
S	25 (34,7 %)	16 (22,2 %)
I	17 (23,6 %)	9 (12,5 %)
R	30 (41,7 %)	47 (65,3 %)
p ($\alpha=0,05$)	0,017	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Posamezni rezultati so prikazani v preglednici X. Pri primerjavi rezultatov metode mikrodilucije z interpretacijami po dveh različnih kriterijih – CLSI in EUCAST smo pričakovano opazili neujemanje rezultatov, ki nastanejo kot posledica različnih interpretacijskih kriterijev.

Statistična analiza je pokazala, da se glede na CLSI in EUCAST razlikujejo interpretacije S, I in R, kar je statistično značilna razlika ($p < 0,05$).

Različno porazdelitev rezultatov prikazuje slika 13.



Slika 13: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij referenčne metode mikrodilucije po kriterijih smernic CLSI in EUCAST za vseh 72 enterobakterij.

Pri MIK vrednosti 16 µg/mL je le-ta opredeljena glede na kriterij smernic CLSI kot S in glede na kriterij smernic EUCAST kot I. Pri vrednosti MIK 32 µg/mL po EUCAST izolat že opredelimo kot R, po CLSI pa kot I.

4.1.2 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z DISK DIFUZIJSKO METODO

Za difuzijo piperacilina s tazobaktamom z diskov smo uporabili dve različni koncentraciji, glede na ustrezne smernice – CLSI ali EUCAST. Posamezni rezultati so v preglednici X. Preglednica XII prikazuje primerjavo rezultatov občutljivosti vseh izolatov z disk difuzijsko metodo.

Preglednica XII: Primerjava razporeditve občutljivosti enterobakterij pri disk difuziji glede na CLSI in EUCAST.

Občutljivost \ Smernica	CLSI (100/10 µg)	EUCAST (30/6 µg)
S	28 (38,9 %)	18 (25,0 %)
I	26 (36,1 %)	27 (37,5 %)
R	18 (25,0 %)	27 (37,5 %)
p (α=0,05)	0,136	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Statistična analiza ni pokazala statistično pomembne razlike med uporabo diska s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 100/10 µg, katerega rezultate interpretiramo po smernicah CLSI ter diska s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 30/6 µg, katerega rezultate interpretiramo po smernicah EUCAST ($p \geq 0,05$).

4.1.3 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH SEVOV ZA PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM Z GRADIENT DIFUZIJSKO METODO

Za gradient difuzijsko metodo smo uporabili gradient difuzijska testa dveh različnih proizvajalcev, in sicer bioMérieux Etest[®] in Liofilchem[®] MIC Test Strip. Posamezni

rezultati so v preglednici X. V preglednici XIII so zbrani rezultati primerjave obeh testov glede na interpretacijo po CLSI in EUCAST.

Preglednica XIII: Primerjava razporeditve občutljivosti enterobakterij pri gradient difuziji glede na CLSI in EUCAST.

Smernica Občutljivost	Biomerieux		Liofilchem	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
S	53 (73,6 %)	45 (62,5 %)	29 (40,3 %)	15 (20,8 %)
I	4 (5,6 %)	8 (11,1 %)	19 (26,4 %)	14 (19,5 %)
R	15 (20,8 %)	19 (26,4 %)	24 (33,3 %)	43 (59,7 %)
p ($\alpha=0,05$)	0,293		0,005	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Iz preglednice XIII lahko razberemo, da v primeru interpretacije gradient difuzijskega testa Biomerieux glede na CLSI in EUCAST, ni statistično pomembne razlike ($p \geq 0,05$), pri gradient difuzijskem testu Liofilchem pa se rezultati statistično razlikujejo ($p < 0,05$).

V preglednici XIV so zbrani rezultati primerjave kriterijev smernic CLSI in EUCAST za gradient difuzijska testa Biomerieux in Liofilchem.

Preglednica XIV: Primerjava razporeditve občutljivosti enterobakterij po različnih kriterijih smernic CLSI in EUCAST.

Smernica Občutljivost	CLSI		EUCAST	
	Biomerieux	Liofilchem	Biomerieux	Liofilchem
S	53 (73,6 %)	29 (40,3 %)	45 (62,5 %)	15 (20,8 %)
I	4 (5,6 %)	19 (26,4 %)	8 (11,1 %)	14 (19,5 %)
R	15 (20,8 %)	24 (33,3 %)	19 (26,4 %)	43 (59,7 %)
p ($\alpha=0,05$)	0,00008 ($p < 0,001$)		0,000002 ($p < 0,001$)	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Iz preglednice XIV razberemo, da se rezultati statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z METODO MIKRODILUCIJE, Z REZULTATI TESTIRANJA Z DISK DIFUZIJSKO METODO, INTERPRETIRANO PO CLSI IN EUCAST

Rezultate MIK, ki smo jih opredelili z referenčno metodo mikrodilucije, smo primerjali z rezultati MIK, ki smo jih opredelili z disk difuzijsko metodo z dvema različnima koncentracijama piperacilina s tazobaktamom glede na smernice CLSI in EUCAST.

4.2.1 DISK DIFUZIJSKA METODA PO CLSI Z DISKOM PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM 110 µg

Občutljivost za piperacilin s tazobaktamom z uporabo diska s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 100/10 µg se testira po smernicah CLSI, zato smo rezultate interpretirali v skladu s smernicami CLSI, kar prikazuje preglednica XV.

Preglednica XV: Primerjava metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg in referenčne metode mikrodilucije po CLSI.

		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj
		S	I	R	
Disk difuzijska metoda po CLSI	S	23	4	1	28 (38,9 %)
	I	2	13	11	26 (36,1 %)
	R	0	0	18	18 (25,0 %)
Skupaj		25 (34,7 %)	17 (23,6 %)	30 (41,7 %)	72 (100,0 %)

Število primerov:	Vrednost κ	P ($\alpha=0,05$)
72		
Meritev zanesljivosti κ	0,630	0,000

Ujemanje metod disk difuzije in mikrodilucije po CLSI					
		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj
		S	I	R	
Disk difuzijska metoda po CLSI	Ujemanje	23	13	18	54
	Majhna napaka	2	4	11	17
	Velika napaka	0	0	0	0
	Zelo velika napaka	0	0	1	1
Skupaj		25	17	30	72

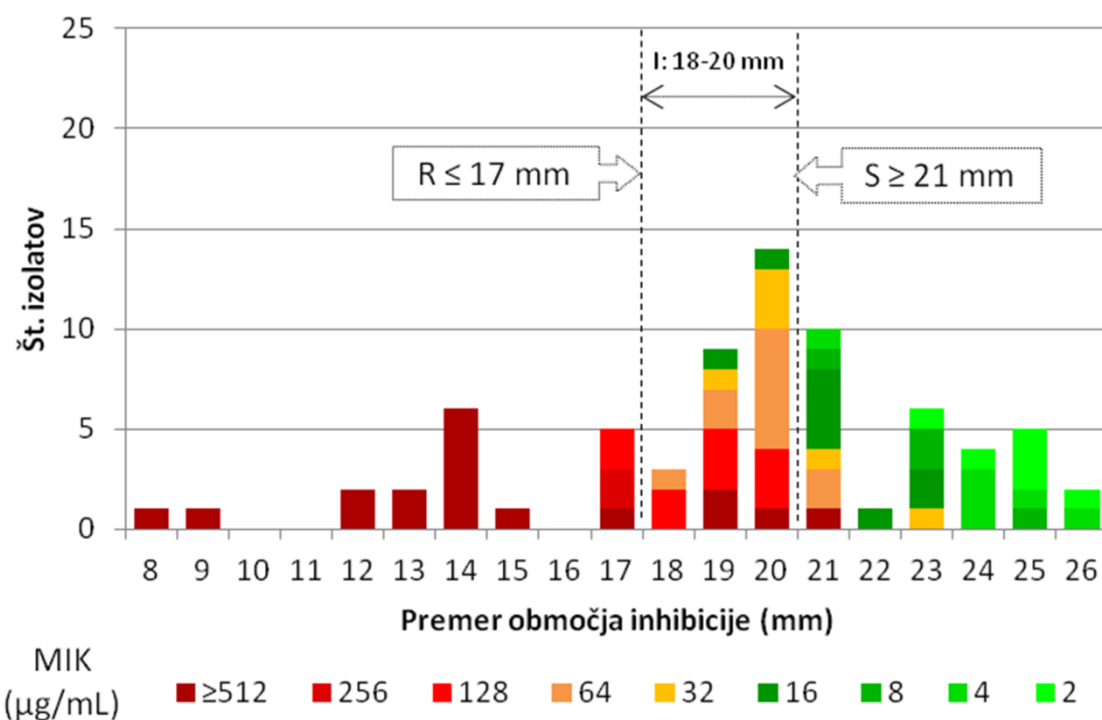
	Frekvenca	%	Kumulativni %
Ujemanje	54	75,0	75,0
Majhna napaka	17	23,6	98,6
Velika napaka	0	0	98,6
Zelo velika napaka	1	1,4	100,0
Skupaj	72	100,0	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p -vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Iz preglednice XV je razvidno, da smo pri metodi difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg dobili le četrtino rezultatov v območju odpornosti, precej več pa v intermediarnem in območju občutljivosti. Metodi mikrodilucije in disk difuzije se pri razporeditvi rezultatov, interpretiranih po CLSI, razlikujeta, razen tistih v območju odpornosti (R). Ti rezultati kažejo, da bi morali pri premeru zaviralne cone pod 22 mm rezultate testiranja občutljivosti preverjati z določitvijo MIK. Pri tej primerjavi metod smo v enem primeru opazili 17 majhnih napak in eno zelo veliko napako.

Skladnost med rezultati meritev difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg in MIK z mikrodilucijo, interpretirano po CLSI, je znašala 75,0 % (koeficient κ 0,630 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev metode disk difuzije z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) od neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po CLSI, so bili rezultati skladni v 90,3 % (koeficient κ 0,791 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$).

Slika 14 pa prikazuje primerjavo mikrodilucije in metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 100/10 µg, testirano in interpretirano po CLSI.



Slika 14: Primerjava mikrodilucije in metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 100/10 µg, testirano in interpretirano po CLSI.

Rdeča polja na sliki 14 prikazujejo odporne seve (R), oranžna intermediarne (I) in zelena občutljive (S), kar pomeni, da je metoda difuzije v agarju z diski dala veliko intermediarnih rezultatov. Hkrati pa lahko s slike 14 razberemo, da se primerjani metodi difuzije v agarju z diski in mikrodilucije v več točkah ne ujemata.

4.2.2 DISK DIFUZIJSKA METODA PO EUCAST Z DISKOM PIPERACILIN S TAZOBAKTAMOM 36 µg

Občutljivost za piperacilin s tazobaktamom z uporabo diska s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 30/6 µg se testira po smernicah EUCAST, zato smo rezultate interpretirali v skladu s smernicami EUCAST. Preglednica XVI prikazuje primerjavo metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg z referenčno metodo mikrodilucije.

Preglednica XVI: Primerjava metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg z referenčno metodo mikrodilucije.

		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj
		S	I	R	
Disk difuzijska metoda po EUCAST	S	14	3	1	18 (25,0 %)
	I	2	5	20	27 (37,5 %)
	R	0	1	26	27 (37,5 %)
Skupaj		16 (22,2 %)	9 (12,5 %)	47 (65,3 %)	72 (100,0 %)

Število primerov:	Vrednost κ	p ($\alpha=0,05$)
72		
Meritev zanesljivosti κ	0,426	0,000

Ujemanje metod disk difuzije in mikrodilucije po EUCAST					
		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj
		S	I	R	
Disk difuzijska metoda po EUCAST	Ujemanje	14	5	26	45
	Majhna napaka	2	4	20	26
	Velika napaka	0	0	0	0
	Zelo velika napaka	0	0	1	1
Skupaj		16	9	47	72

	Frekvenca	%	Kumulativni %
Ujemanje	45	62,5	62,5
Majhna napaka	26	36,1	98,6
Velika napaka	0	0	98,6
Zelo velika napaka	1	1,4	100,0
Skupaj	72	100,0	

EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing),

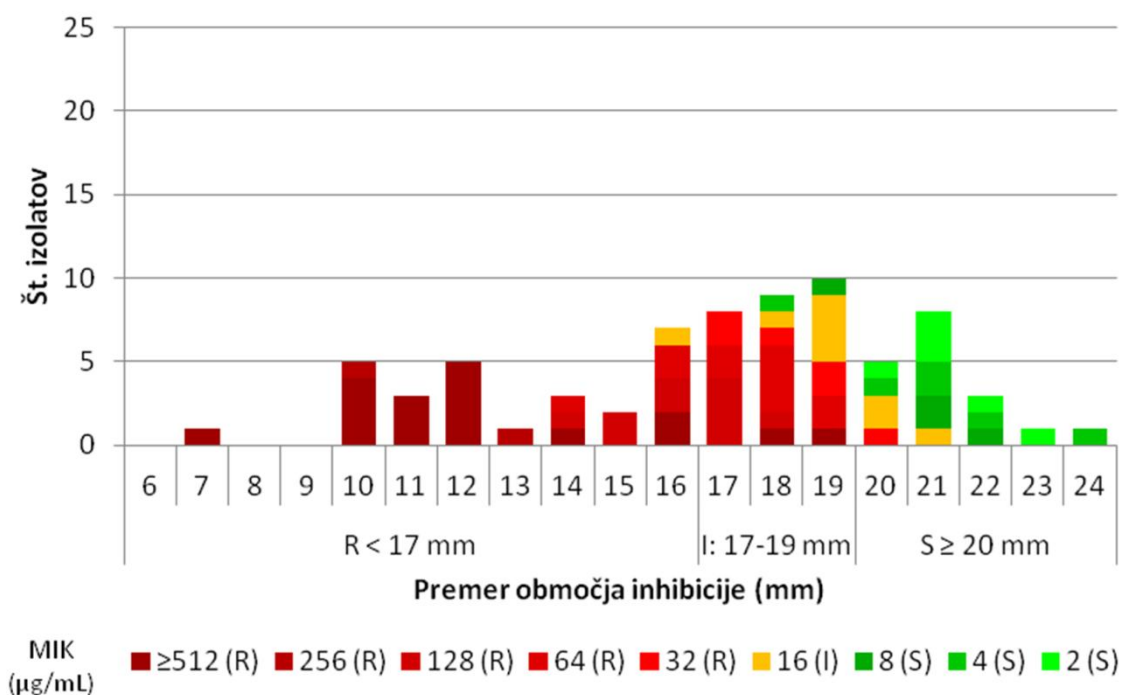
S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Tudi pri metodi difuzije v agarju z diskov, kjer smo imeli diske s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg, smo dobili veliko rezultatov (27) v intermediarnem

območju, ravno tako kot pri diskih s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg in interpretacijo po CLSI. Manj (18) je bilo občutljivih izolatov, veliko (27) je bilo odpornih. Pri primerjavi teh metod smo opazili 26 majhnih in eno zelo veliko napako, velikih napak ni bilo.

Skladnost med rezultati meritev disk difuzije z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg in MIK z mikrodilucijo, interpretirano po EUCAST, je znašala 62,5 % (koeficient κ 0,426 – zmerna zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev disk difuzije z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) od neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po EUCAST, so bili rezultati skladni v 91,7 % (koeficient κ 0,769 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$).

Slika 15 predstavlja rezultate testiranja metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 30/6 µg in primerjavo z referenčno metodo mikrodilucije.



Slika 15: Primerjava referenčne metode mikrodilucije in metode difuzije v agarju z diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 30/6 µg.

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z METODO MIKRODILUCIJE, Z REZULTATI TESTIRANJA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ, OPREDELJENIH Z GRADIENT DIFUZIJSKIMI TESTI DVEH RAZLIČNIH PROIZVAJALCEV, INTERPRETIRANO PO CLSI IN EUCAST

Rezultate MIK, opredeljene z referenčno metodo mikrodilucije, smo primerjali z rezultati MIK, opredeljenimi z gradient difuzijskimi testi dveh različnih proizvajalcev Biomerieux in Liofilchem, interpretiranih po CLSI in EUCAST.

4.3.1 GRADIENT DIFUZIJSKI TEST – INTERPRETACIJA PO CLSI

Z referenčno metodo mikrodilucije smo primerjali gradient difuzijska testa proizvajalcev Biomerieux in Liofilchem, ki smo jih interpretirali po kriterijih smernic CLSI.

Gradient difuzijski test proizvajalca Biomerieux – Interpretacija po CLSI – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije

Preglednica XVII prikazuje primerjavo gradient difuzijskega testa Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije.

Preglednica XVII: Primerjava gradient difuzijskega testa proizvajalca Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije po kriteriju CLSI.

		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Biomerieux) po CLSI	S	25	17	11	53 (73,6 %)
	I	0	0	4	4 (5,6 %)
	R	0	0	15	15 (20,8 %)
Skupaj		25 (34,7 %)	17 (23,6 %)	30 (41,7 %)	72 (100,0 %)

Število primerov: 72	Vrednost K	P ($\alpha=0,05$)
Meritev zanesljivosti K	0,310	0,000

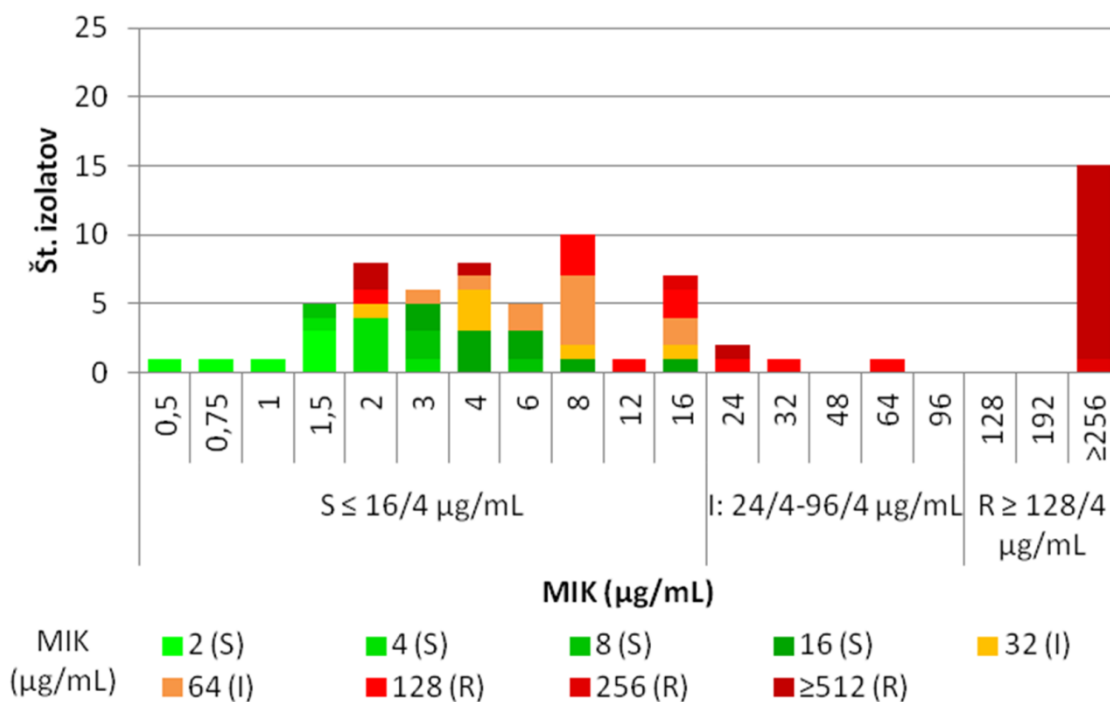
Ujemanje metod mikrodilucije in gradient difuzije (Biomerieux) po CLSI									
		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj		Frekvenca	%	Kumulativni %
		S	I	R					
Gradient difuzija (Biomerieux) po CLSI	Ujemanje	25	0	15	40	Ujemanje	40	55,6	55,6
	Majhna napaka	0	17	4	21	Majhna napaka	21	29,2	84,7
	Velika napaka	0	0	0	0	Velika napaka	0	0	84,7
	Zelo velika napaka	0	0	11	11	Zelo velika napaka	11	15,3	100,0
Skupaj		25	17	30	72	Skupaj	72	100,0	

CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Pri tej metodi smo opazili 11 zelo velikih napak.

Skladnost med rezultati meritev MIK z gradient difuzijskim testom Biomerieux in z mikrodilucijo, interpretirano po CLSI, je znašala 55,6 % (koeficient κ 0,310 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev gradient difuzijskega testa Biomerieux z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po CLSI, so bili rezultati skladni v 61,1 % (koeficient κ 0,320 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$).

Grafično predstavitev primerjave gradient difuzijskega testa proizvajalca Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po kriterijih smernice CLSI, prikazuje slika 16.



Slika 16: Primerjava gradient difuzijskega testa Biomerieux z mikrodilucijo po kriterijih smernice CLSI.

Z gradient difuzijskim testom Biomerieux po kriteriju CLSI smo zelo veliko število izolatov opredelili kot občutljivih (S), razen petnajstih, ki so bili odporni (R) ter nekaj intermediarnih (I). Vendar pa, če gradient difuzijsko metodo primerjamo z mikrodilucijo, vidimo, da se metodi ujemata le pri določenem številu občutljivih izolatov, glede intermediarnih in odpornih pa ne dajeta enakih rezultatov.

Gradient difuzijski test proizvajalca Liofilchem – Interpretacija po CLSI – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije

V preglednici XVIII vidimo primerjavo gradient difuzijskega testa proizvajalca Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije.

Preglednica XVIII: Primerjava rezultatov, pridobljenih z gradient difuzijskim testom proizvajalca Liofilchem, z referenčno metodo mikrodilucije, po kriteriju CLSI.

		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Liofilchem) po CLSI	S	23	4	2	29 (40,3 %)
	I	2	10	7	19 (26,4 %)
	R	0	3	21	24 (33,3 %)
Skupaj		25 (34,7 %)	17 (23,6 %)	30 (41,7 %)	72 (100,0 %)

Število primerov:	Vrednost κ	p ($\alpha=0,05$)
72		
Meritev zanesljivosti κ	0,621	0,000

Ujemanje metod mikrodilucije in gradient difuzije (Liofilchem) po CLSI					
		Metoda mikrodilucije po CLSI			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Liofilchem) po CLSI	Ujemanje	23	10	21	54
	Majhna napaka	2	7	7	16
	Velika napaka	0	0	0	0
	Zelo velika napaka	0	0	2	2
Skupaj		25	17	30	72

	Frekvenca	%	Kumulativni %
Ujemanje	54	75,0	75,0
Majhna napaka	16	22,2	97,2
Velika napaka	0	0	97,2
Zelo velika napaka	2	2,8	100,0
Skupaj	72	100,0	

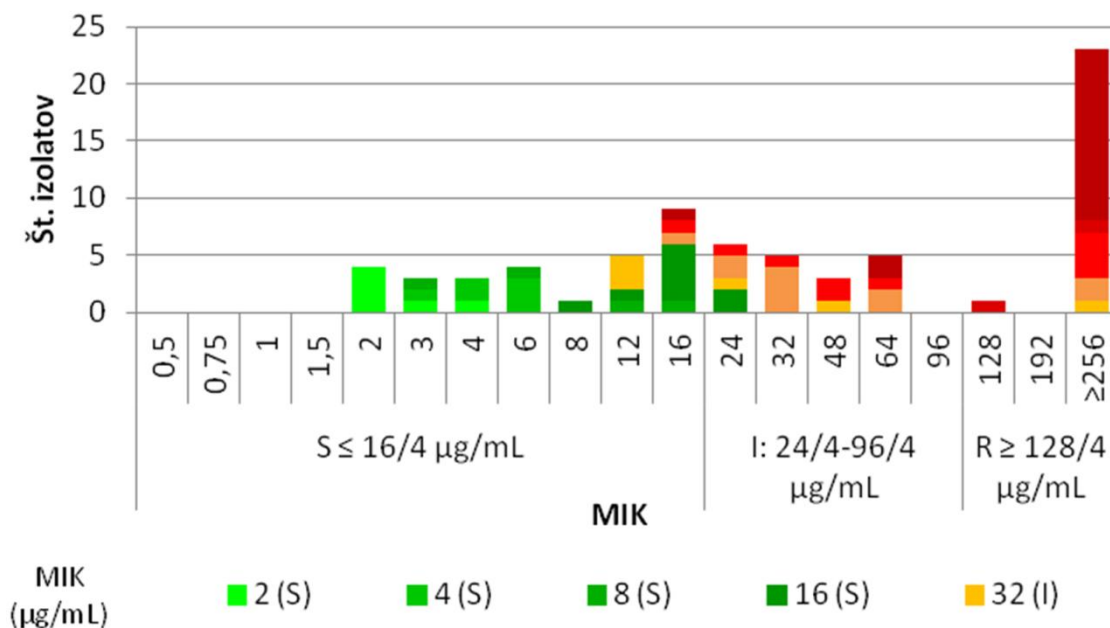
CLSI – inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Pri tej metodi smo opazili 2 zelo veliki napaki.

Skladnost med rezultati meritev MIK z gradient difuzijskim testom Liofilchem in z mikrodilucijo, interpretirano po CLSI, je znašala 75,0 % (koeficient κ 0,621 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev gradient difuzijskega testa Liofilchem z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po CLSI, so bili rezultati skladni v 88,9 % (koeficient κ 0,764 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$).

Iz preglednic XVII in XVIII je razvidno, da se gradient difuzijska testa Biomerieux in Liofilchem razlikujeta, saj so rezultati, ki smo jih dobili z gradient difuzijskim testom proizvajalca Liofilchem in interpretirali po kriteriju smernic CLSI, drugačni kot rezultati, ki smo jih dobili z gradient difuzijskim testom proizvajalca Biomerieux po kriteriju CLSI.

Slika 17 prikazuje primerjavo gradient difuzijskega testa Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije, ki smo ju interpretirali po kriterijih smernice CLSI.



Slika 17: Primerjava gradient difuzijskega testa Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po CLSI.

Kot vidimo na sliki 17, so rezultati, pridobljeni z gradient difuzijskim testom Liofilchem po kriteriju CLSI, enakomernejše porazdeljeni, razen velikega števila odpornih izolatov.

4.3.2 GRADIENT DIFUZIJSKI TEST – INTERPRETACIJA PO EUCAST

Z referenčno metodo mikrodilucije smo primerjali gradient difuzijska testa proizvajalcev Biomerieux in Liofilchem, ki smo jih interpretirali po kriterijih smernic EUCAST.

Gradient difuzijski test Biomerieux – Interpretacija po EUCAST – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije

V preglednici XIX vidimo primerjavo gradient difuzijskega testa proizvajalca Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po kriteriju smernice EUCAST.

Preglednica XIX: Primerjava gradient difuzijskega testa Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije po EUCAST.

		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Biomerieux) po EUCAST	S	16	8	21	45 (62,5 %)
	I	0	1	7	8 (11,1 %)
	R	0	0	19	19 (26,4 %)
Skupaj		16 (22,2 %)	9 (12,5 %)	47 (65,3 %)	72 (100,0 %)

Število primerov:	Vrednost κ	p ($\alpha=0,05$)
72		
Meritev zanesljivosti κ	0,259	0,000

Ujemanje metod mikrodilucije in gradient difuzije (Biomerieux) po EUCAST					
		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Biomerieux) po EUCAST	Ujemanje	16	1	19	36
	Majhna napaka	0	8	7	15
	Velika napaka	0	0	0	0
	Zelo velika napaka	0	0	21	21
Skupaj		16	9	47	72

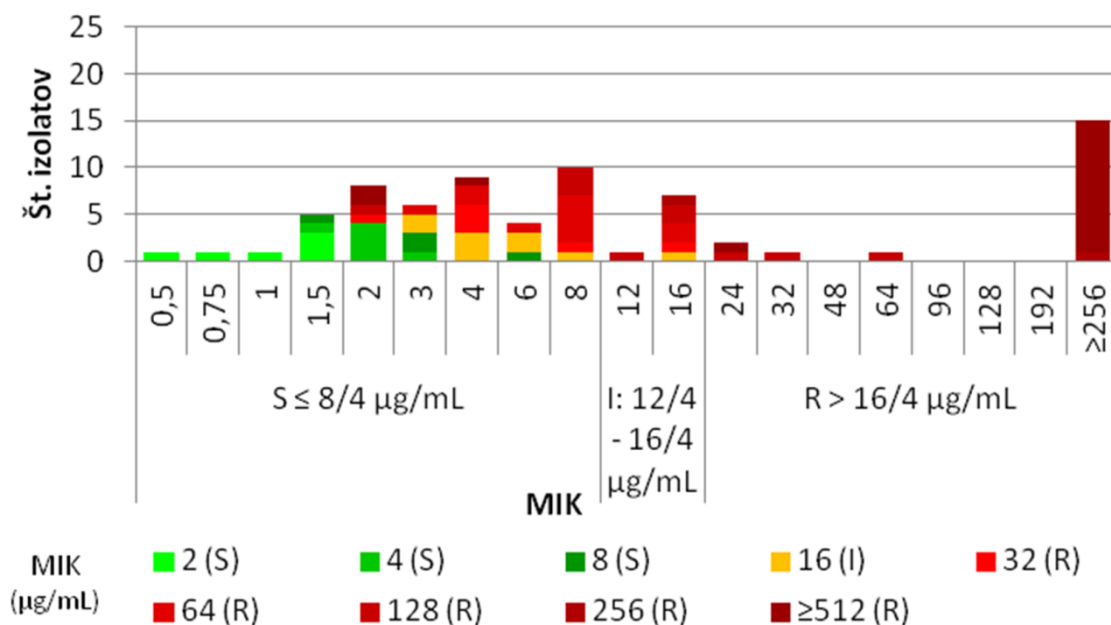
	Frekvenca	%	Kumulativni %
Ujemanje	36	50,0	50,0
Majhna napaka	15	20,8	70,8
Velika napaka	0	0	70,8
Zelo velika napaka	21	29,2	100,0
Skupaj	72	100,0	

EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p -vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Z interpretacijo gradient difuzijskega testa proizvajalca Biomerieux po EUCAST smo dobili večino rezultatov (45) v območju občutljivosti (S), razen zelo odpornih (R) 19 izolatov ter 8 izolatov v intermediarnem območju (I). Pri referenčni metodi mikrodilucije smo dobili rezultate MIK 16 S, 9 I in 47 R. Pri tej primerjavi metod smo v tem primeru opazili 21 zelo velikih napak.

Skladnost med rezultati meritev MIK z gradient difuzijskim testom Biomerieux in z mikrodilucijo, interpretirano po EUCAST, je znašala 50,0 % (koeficient κ 0,259 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev gradient difuzijskega testa Biomerieux z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po EUCAST, so bili rezultati skladni v 59,7 % (koeficient κ 0,293 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$).

Isti dve metodi smo grafično prikazali na sliki 18.



Slika 18: Primerjava gradient difuzijskega testa Biomerieux z referenčno metodo mikrodilucije po EUCAST.

Gradient difuzijski test Liofilchem – Interpretacija po EUCAST – Primerjava z referenčno metodo mikrodilucije

Preglednica XX prikazuje primerjavo gradient difuzijskega testa proizvajalca Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po kriteriju smernice EUCAST.

Preglednica XX: Primerjava gradient difuzijskega testa Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije po EUCAST.

		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj
		S	I	R	
Gradient difuzija (Liofilchem) po EUCAST	S	14	1	0	15 (20,8 %)
	I	2	6	6	14 (19,5 %)
	R	0	2	41	43 (59,7 %)
Skupaj		16 (22,2 %)	9 (12,5 %)	47 (65,3 %)	72 (100,0 %)

Število primerov: 72	Vrednost κ	P ($\alpha=0,05$)
Meritev zanesljivosti κ	0,717	0,000

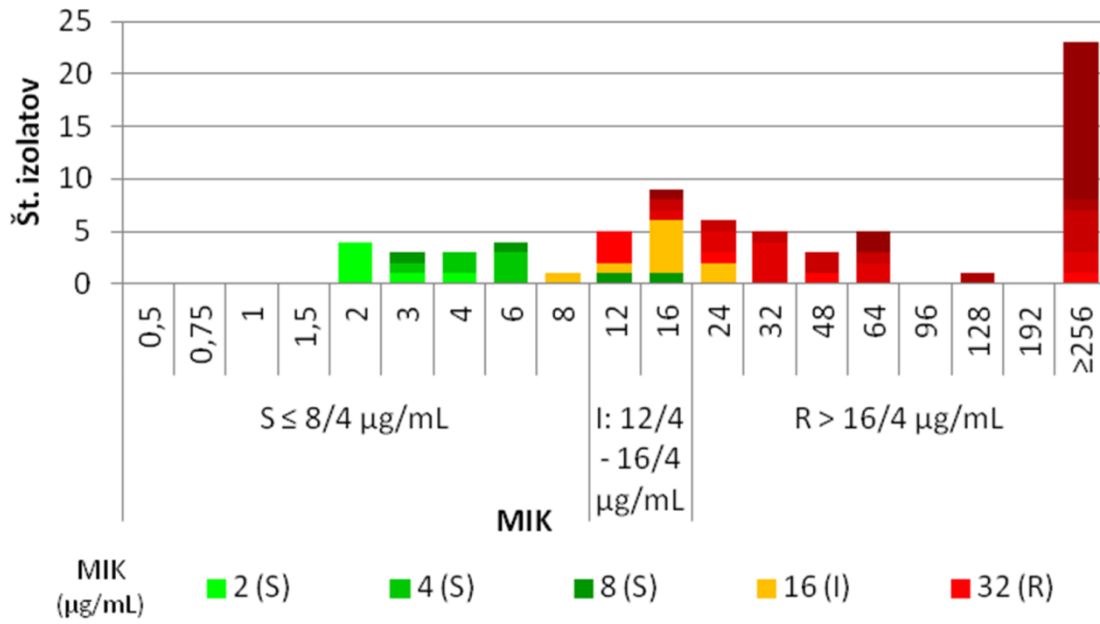
Ujemanje metod mikrodilucije in gradient difuzije (Liofilchem) po EUCAST									
		Metoda mikrodilucije po EUCAST			Skupaj		Frekvenca	%	Kumulativni %
		S	I	R					
Gradient difuzija (Liofilchem) po EUCAST	Ujemanje	14	6	41	61	Ujemanje	61	84,7	84,7
	Majhna napaka	2	3	6	11	Majhna napaka	11	15,3	100,0
	Velika napaka	0	0	0	0	Velika napaka	0	0	100,0
	Zelo velika napaka	0	0	0	0	Zelo velika napaka	0	0	100,0
	Skupaj	16	9	47	72	Skupaj	72	100,0	

EUCAST – evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen, κ – Cohenov koeficient kappa, p – p-vrednost, α – stopnja pomembnosti testa

Ko smo iste rezultate, ki nam jih je dal gradient difuzijski test Liofilchem v primerjavi z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirali po kriterijih smernic EUCAST, smo dobili veliko lepšo porazdelitev rezultatov kot pri interpretaciji po CLSI: 15 občutljivih (S), 14 intermediarno občutljivih (I) ter 43 odpornih (R) izolatov. Rezultati mikrodilucije so bili 16 S, 9 I in 47 R. Pri tej metodi nismo opazili niti velikih niti zelo velikih napak.

Skladnost med rezultati meritev MIK z gradient difuzijskim testom Liofilchem in z mikrodilucijo, interpretirano po EUCAST, je znašala 84,7 % (koeficient κ 0,717 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Ko smo primerjali skladnost meritev gradient difuzijskega testa Liofilchem z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, interpretirano po EUCAST, so bili rezultati skladni v 95,8 % (koeficient κ 0,877 – skoraj popolna oziroma zelo dobra zanesljivost; $p < 0,05$).

Isti gradient difuzijski test proizvajalca Liofilchem smo grafično primerjali z mikrodilucijo, kar prikazuje slika 19.



Slika 19: Primerjava gradient difuzijskega testa Liofilchem z referenčno metodo mikrodilucije, interpretirano po EUCAST.

5 RAZPRAVA

Enterobakterije so pomemben del normalne črevesne flore in sodijo med najpomembnejše in najpogostejše povzročitelje okužb tako v domačem kot tudi v bolnišničnem okolju (2). Povzročajo velik del okužb sečil in bakteriemij ter okužb gastrointestinalnega trakta (3). So povzročitelji pomembnega deleža okužb v trebušni votlini ter okužb dihal. Najdemo jih lahko tudi v likvorju, sklepni tekočini in v abscesih (2). Kombinacija piperacilin s tazobaktamom je antibiotik za parenteralno uporabo, ki se uporablja za zdravljenje intraabdominalnih okužb, povišane telesne temperature neznanega izvora pri nevtropeničnih bolnikih, bolnišnični pljučnici, okužbah kože in mehkih tkiv vključno z okužbami diabetičnega stopala, okužbah sečil, kosti in sklepov, ginekoloških okužbah in okužbah krvi (22, 23). Poseben terapevtski izziv predstavljajo enterobakterije, ki izločajo encime ESBL. Za zdravljenje okužb z enterobakterijami, ki izločajo ESBL, se uporablja predvsem fluorokinolone in karbapeneme (63). Za zdravljenje okužb z enterobakterijami, ki izločajo ESBL, se lahko uporablja tudi piperacilin s tazobaktamom, v kolikor so bakterije nanj občutljive. Testiranje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri tovrstnih bakterijah je težavno, saj opažamo neskladje med rezultati testiranja ob uporabi različnih metod.

V naši nalogi smo z referenčno metodo mikrodilucije določili MIK izbranih sevov za piperacilin s tazobaktamom. Metoda mikrodilucije je tehnično zahtevna in zamudna metoda in se v rutinskem delu v kliničnih laboratorijih uporablja le izjemoma. Osnovni namen naše naloge je bil ugotoviti, katera od rutinsko uporabljenih metod – disk difuzijska ali gradient difuzijska metoda – je najprimernejša za rutinsko opredelitev občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri izolatih enterobakterij, ki izločajo encime ESBL, glede na ujemanje rezultatov z referenčno metodo mikrodilucije.

Ko smo primerjali vsako posamezno metodo glede na različna kriterija smernic CLSI in EUCAST, smo tako pri referenčni metodi mikrodilucije (rezultate prikazuje preglednica XI) kot pri gradient difuzijski metodi (rezultate prikazujeta preglednici XIII in XIV) ugotovili pričakovano statistično značilno razliko ($p < 0,05$) kot posledico različnih interpretacijskih kriterijev. Izjemi sta se pojavili le v dveh primerih, in sicer pri disk difuzijski metodi (rezultati so prikazani v preglednici XII) ter pri gradient difuzijski metodi proizvajalca Biomerieux (rezultati so prikazani v preglednici XIII), kjer nismo zasledili

statistično značilne razlike ($p \geq 0,05$).

Pri testiranju občutljivosti po smernicah CLSI smo opazili, da je bilo pri testiranju z disk difuzijsko metodo ujemanje 75,0 % (koeficient κ 0,630 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$), v 17 (23,6 %) primerih smo opazili majhno napako in pri enem (1,4 %) zelo veliko napako; rezultati so zbrani v preglednici XV. Primerjava skladnosti meritev iste metode z referenčno metodo mikrodilucije, za ločevanje občutljivih (kategorija S) od neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, je pokazala skladnost rezultatov v 90,3 % (koeficient κ 0,791 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Pri testiranju z gradient difuzijsko metodo smo pri testnem lističu proizvajalca Biomerieux opazili ujemanje v 55,6 % primerov (koeficient κ 0,310 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$), majhno napako v 21 (29,2 %) primerih, pri 11 primerih (15,3 %) pa je prišlo do zelo velike napake; rezultati so zbrani v preglednici XVII. Ko smo primerjali skladnost meritev istega testa z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, so bili rezultati skladni v 61,1 % (koeficient κ 0,320 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$). Pri testiranju z gradient difuzijsko metodo smo pri testnem lističu proizvajalca Liofilchem opazili ujemanje v 75,0 % primerov (koeficient κ 0,621 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$), majhno napako v 16 (22,2 %) primerih, pri 2 primerih (2,8 %) pa je prišlo do zelo velike napake; rezultati so zbrani v preglednici XVIII. Ko smo primerjali skladnost meritev istega testa z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, so bili rezultati skladni v 88,9 % (koeficient κ 0,764 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Ti rezultati kažejo, da se je testni listič proizvajalca Liofilchem z uporabo CLSI kriterijev izkazal za boljšega od testnega lističa proizvajalca Biomerieux za določanje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom, zato ni vseeno, katerega vzamemo za testiranje. Disk difuzijska metoda z uporabo kriterijev smernice CLSI se je izkazala za primerljivo s testnim lističem proizvajalca Liofilchem z uporabo kriterijev po CLSI (preglednici XV in XVIII).

Pri testiranju občutljivosti po smernicah EUCAST smo pri testiranju z disk difuzijsko metodo, opazili ujemanje v 62,5 % primerov (koeficient κ 0,426 – zmerna zanesljivost; $p < 0,05$), majhno napako smo opazili v 26 primerih (36,1 %), pri enem (1,4 %) primeru pa je prišlo do zelo velike napake, kar prikazuje preglednica XVI. Velikih napak nismo opazili. Ko smo primerjali skladnost meritev iste metode z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) od neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, so bili rezultati

skladni celo v 91,7 % (koeficient κ 0,769 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$), kar je navsezadnje klinično najbolj pomembno, saj nas zanima občutljivost populacije. Pri testiranju z gradient difuzijsko metodo smo pri testnem lističu proizvajalca Biomerieux opazili ujemanje v 50,0 % primerov (koeficient κ 0,259 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$), majhno napako v 15 (20,8 %) primerih, pri 21 primerih (29,2 %) pa je prišlo do zelo velikih napak, kar prikazuje preglednica XIX. Ko smo primerjali skladnost meritev istega testa z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, so bili rezultati skladni v 59,7 % (koeficient κ 0,293 – dokajšnja zanesljivost; $p < 0,05$). Pri testiranju z gradient difuzijsko metodo smo pri testnem lističu proizvajalca Liofilchem opazili ujemanje v 84,7 % primerov (koeficient κ 0,717 – znatna oziroma dobra zanesljivost; $p < 0,05$), majhno napako v 11 (15,3 %) primerih, velikih ali zelo velikih napak nismo opazili. Rezultati so zbrani v preglednici XX. Ko smo primerjali skladnost meritev istega testa z mikrodilucijo, za ločevanje občutljivih (kategorija S) in neobčutljivih (kategoriji I in R) izolatov, so bili rezultati skladni celo v 95,8 % (koeficient κ 0,877 – skoraj popolna oziroma zelo dobra zanesljivost; $p < 0,05$). Ti rezultati kažejo, da se je testni listič proizvajalca Liofilchem z uporabo EUCAST kriterijev izkazal za boljšega od disk difuzijske metode in bistveno boljšega od testnega lističa proizvajalca Biomerieux za določanje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom.

Podobno, kot so ugotavljali v študiji že Titelman in sodelavci, smo ugotovili, da je testiranje občutljivosti enterobakterij, ki izločajo ESBL za piperacilin s tazobaktamom, težavno. Titelman in sodelavci so v podobni študiji ugotovili, da se ob primerjavi gradient difuzijskih testov z mikrodilucijsko metodo kot zlati standard pojavlja preveč velikih ali zelo velikih napak, kar kaže na težavo s kalibracijo gradient difuzijskih testnih lističev (64). Izsledki študije Titelman in sodelavcev so med drugim prispevali k zaostritvi kriterijev za piperacilin s tazobaktamom po EUCAST. EUCAST kriteriji, ki smo jih uporabili v naši nalogi, so trenutno veljavni kriteriji, ki so bili sprejeti v veljavo po študiji Titelman in sodelavcev.

Pri določanju občutljivosti bakterijskih izolatov na antibiotike je pomembno, katere metode in kriterije uporabimo, saj je cilj testiranja odkriti morebitno odpornost na antibiotik oziroma zagotoviti, da je izolirana bakterija nanj občutljiva in bo zdravljenje uspešno. S tem se tudi izognemo nepotrebnemu razvoju rezistence ob nepravilni uporabi antibiotikov. Ker pa je nujna primerljivost rezultatov med posameznimi laboratoriji,

uporabljamo mednarodne standarde, ki natančno opredeljujejo metode za določanje občutljivosti ter kriterije za interpretacijo rezultatov. Vsaka metoda za določanje občutljivosti ima tako prednosti kot pomanjkljivosti. Nekatere metode zagotavljajo kvantitativne rezultate (MIK), vse pa dajejo kvalitativne ocene občutljiv, vmesen ali odporen. V splošnem metode za določanje občutljivosti omogočajo točno odkrivanje protimikrobne odpornosti. Vendar pa novejši in novo nastajajoči mehanizmi odpornosti zahtevajo nenehno spremljanje ustreznosti vsake metode za določanje občutljivosti.

6 SKLEP

Na podlagi naših rezultatov smo ugotovili, da so metode mikrodilucija, disk difuzija in gradient difuzija ustrezne za določanje občutljivosti izbranih izolatov enterobakterij, ki izločajo encime ESBL, za antibiotik piperacilin s tazobaktamom, vendar niso vse med sabo primerljive glede ustreznosti rezultatov, saj nekatere dajejo bolj zanesljive rezultate kot druge (glede na referenčno metodo mikrodilucije), k čemur prispevajo tudi različni kriteriji smernic CLSI in EUCAST.

Na podlagi rezultatov referenčne metode mikrodilucije smo ugotovili, da pride pri uporabi dveh različnih kriterijev smernic CLSI in EUCAST do statistično značilne razlike. Rezultati, ki smo jih dobili z disk difuzijsko metodo po dveh različnih smernicah (diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg po CLSI in diski s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 36 µg po EUCAST) se statistično značilno ne razlikujejo. Edini test, ki poleg diskov za disk difuzijo ni pokazal statistično značilne razlike med kriteriji smernic CLSI in EUCAST, je bil gradient difuzijski test proizvajalca Biomerieux.

Na podlagi naših rezultatov smo ugotovili, da sta pri uporabi kriterijev CLSI najprimernejši metodi za določanje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri enterobakterijah, ki izločajo encime ESBL, gradient difuzijska metoda proizvajalca Liofilchem in disk difuzijska metoda z uporabo diskov s koncentracijo piperacilina s tazobaktamom 110 µg. Obe metodi imata statistično znatno oziroma dobro zanesljivost kappa. Pri uporabi kriterijev EUCAST je prav tako najprimernejša metoda za določanje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri enterobakterijah, ki izločajo encime ESBL, gradient difuzijska metoda proizvajalca Liofilchem, ki ima statistično znatno oziroma dobro zanesljivost kappa. Ko primerjamo le kategoriji občutljiv (S) in neobčutljiv (I in R), kar je klinično tudi najbolj pomembno, ima gradient difuzijski test proizvajalca Liofilchem skoraj popolno oziroma zelo dobro zanesljivost. Rezultati testiranja z disk difuzijsko metodo po EUCAST, ki ima statistično zmerno zanesljivost kappa ter dobro zanesljivost, ko primerjamo le kategoriji občutljiv (S) in neobčutljiv (I in R), so primerljivi z referenčno metodo mikrodilucije in gradient difuzijsko metodo proizvajalca Liofilchem in primerni za določanje občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom pri enterobakterijah, ki izločajo encime ESBL, v rutinskem delu v kliničnem laboratoriju.

7 LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Drugs used in the treatment of infections and cancer. V: Rang and Dale's Pharmacology. 6th edition. Dimock K, McGrath S, Cook L. Elsevier limited. 2007: 45: 647–660.
2. Donnenberg M. *Enterobacteriaceae*. V: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th edition. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Elsevier Churchill Livingstone. 2005: 2567–2568.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Enterobacteriaceae*. V: Medical Microbiology. 6th edition. Schmitt W, DeFrancesco K. Mosby Elsevier. 2009: 30: 301–316.
4. Štrumbelj I, Berce I, Čretnik - Žohar T, Harlander T, Jeverica S, Kavčič M, Kolman J, Lorenčič - Robnik S, Mueller - Premru M, Paragi M, Piltaver Vajdec I, Pirš M, Ribič H, Seme K, Tomič V, Zdolšek B, Žolnir - Dovč M. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike - Slovenija 2012. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2013. 1. izdaja. Dosegljivo na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz> [dostop 11. 5. 2014]
5. Yao JDC, Moellering RC, Jr. Antibacterial Agents. V: Manual of Clinical Microbiology. 10th edition. Versalovic J. ASM Press. 2011: 65: 1043–1081.
6. Allison DG, Gilbert P, Lambert PA. Antimicrobial action: Basic principles. V: Molecular Medical Microbiology. Sussman M. Elsevier Ltd. 2002: 26: 585–590.
7. Korzybski T, Kowszyk-Gindifer Z, Kuryłowicz W. Antibiotics Origin, Nature and Properties. PWN – Polish Scientific Publishers. 1967: 1–7.
8. Kotnik V. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M, Ihan A. Ljubljana, Medicinski razgledi 2002: 427–438.
9. Verbist L. Comparison of the Activities of the New Ureidopenicillins Piperacillin, Mezlocillin, Azlocillin, and Bay k 4999 Against Gram-Negative Organisms. V: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Aug 1979; 16(2): 115–119.
10. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7C2B5837C9AE8D05C12579EC00200249/\\$File/s-008400.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7C2B5837C9AE8D05C12579EC00200249/$File/s-008400.pdf) [dostop 30. 4. 2014]
11. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Antimicrobial chemotherapy. V: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 20th ed. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Prentice Hall International Inc. London, 1991: 137–166.

12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53786998&viewopt=PubChem#x281> [dostop 10. 11. 2014]
13. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/mono1500007575/piperacillin?q=unauthorize> [dostop 1. 3. 2015]
14. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan 1; 42(1): D1091–7. PubMed ID: 24203711
15. Castle SS. Piperacillin. V: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Enna SJ, Bylund DB. Elsevier. 2007: 1–5.
16. <http://www.drugs.com/ppa/piperacillin-sodium.html/> [dostop 30. 4. 2014]
17. http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/Referrals_document/Tazocin_30/WC500098367.pdf/ [dostop 30. 4. 2014]
18. Gentry OL, Jemsek GJ, Natelson AE. Effects of sodium piperacillin on platelet function in normal volunteers. V: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Apr. 1981: 532–533.
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/123630?from=summary> [dostop 10. 11. 2014]
20. <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/mono1500009220/tazobactam?q=unauthorize> [dostop 1. 3. 2015]
21. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy: 2013*. Ur.: David N. Gilbert...[et al.] – 43rd ed. Antimicrobial Therapy, Incorporated, 2013.
22. EUCAST, Piperacillin-tazobactam, Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0, 22. 11. 2010.
23. Čižman M., Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. 2. dopolnjena izd. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva, 2013 (Ljubljana, Povše).
24. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/C68A6196BF0ADACEC12579EC0020035D/\\$File/s-013200.pdf/](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/C68A6196BF0ADACEC12579EC0020035D/$File/s-013200.pdf/) [dostop 30. 4. 2014]
25. Guidos RJ. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. *The Author* 2011. *Clin Infect Dis.* May 1, 2011; 52 (Suppl 5): S397–S428.

26. Seme K. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M, Ihan A. Ljubljana, Medicinski razgledi 2002a: 439–446.
27. WHO 2000. Overcoming antibiotic resistance. World Health Organization Report in Infectious Diseases. World Health Organization, Geneva.
28. MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial stewardship program in health care systems. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18, 4: 638–656.
29. Mueller-Premru M. Mehanizmi odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 22.–23. jun. 2001. Mueller-Premru M, Gubina M (ur.), Ljubljana, Medicinska fakulteta: 27–37.
30. Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. V: *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edition. Versalovic J. ASM Press. 2011: 66: 1082–1114.
31. Bush K, Jacoby GA. Minireview. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2010, p. 969–976.
32. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep-Dec; 2(3): 263–274.
33. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. Oct. 2005; 18(4): 657–686.
34. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ*. Nov 22, 2003; 327(7425): 1209–1213.
35. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. Jan 2004; 48(1): 1–14.
36. 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.
37. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl. 1): 144–153.
38. Patel JB, Tenover FC, Turnidge JD, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. V: *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edition. Versalovic J. ASM Press. 2011: 68: 1122–1143.

39. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Reller L B, Weinstein M. *Clin Infect Dis.* (2009) 49(11): 1749–1755.
40. Lorian V, Burns L. Predictive value of susceptibility tests for the outcome of antibacterial therapy. *J Antimicrob Chemother.* 1990 25: 175–81.
41. Courvalin P. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *V: Clin Microbiol Infect.* 1996 Feb; 2 Suppl 1: S26–S34.
42. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Eight Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
43. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E. Def 3.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infec*2000; 6: 509–515.
44. Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine / [avtorji Vladimir Kotnik ... [et al.]; glavni urednik Vladimir Kotnik; slike Veronika Strašek ... et al.]. – Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2011.
45. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *V: Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61, 1295–1301.
46. EUCAST Definitive Document E.Def 1.2: terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infec* 2000; 6: 503–508.
47. CLSI M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Informational Supplement (2013).
48. <http://www.atcc.org/> [dostop 20. 1. 2014]
49. http://www.oxid.com/UK/BLUE/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0331&c=UK&lang=EN/ [dostop 10. 3. 2014]
50. 8th WORKSHOP. Profesor V. J. Benedi. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. A practical Approach. 20–25 June 2010, Palma de Mallorca, Spain.

51. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
52. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>
53. [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007393\(11\)\(0706\).pdf/](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007393(11)(0706).pdf/) [dostop 10. 3. 2014]
54. [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8840621\(201107\).pdf#page=1&view=Fit/](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8840621(201107).pdf#page=1&view=Fit/) [dostop 10. 3. 2014]
55. Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, univerzitetni program / [avtorji Tjaša Cerar ... et al.]; urednica Eva Ružič-Sabljić; [slike Eva Ružič-Sabljić, Mateja Pirš; risbe Katja Strašek]. – Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2010.
56. MIC Test Strip Quantitative assay for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); LD[®], Liofilchem[®] s.r.l.
57. Zagode M. Primerjava petih metod za ugotavljanje odpornosti enterokokov proti glikopeptidom. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota za medoddelčni študij mikrobiologije, 2005.
58. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/em%C5%A1f-Farmaceutvska_informatika/2010-2011/Predavanja/FI-08_Neparametricni_testi.pdf [dostop 22. 11. 2014]
59. <http://www.texasoft.com/tutorial-chisquare-crosstabulation.html> [dostop 22. 11. 2014]
60. <http://www.stattutorials.com/SPSS/TUTORIAL-SPSS-Interrater-Reliability-Kappa.htm> [dostop 2. 4. 2015]
61. Landis, J. R., Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159–174.
62. Altman DG (1991) Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall.
63. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Nov 25; 19(2): 141–60.

64. Titelman E, Iversen A, Kahlmeter G, Giske CG. Antimicrobial susceptibility to parenteral and oral agents in a largely polyclonal collection of CTX-M-14 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *APMIS*. 2011 Oct 17; 119(12): 853–63.