

MEDICINSKI GLASNIK

Official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina

Volume 7 Number 1, February 2010.

ISSN 1840-0132



**Thematic issue:
Genitourinary tract infections**

Fenix[®]

PANTOPRAZOL
želučanootporne tablete

- savremena farmaceutska formulacija
 - snažni visokoselektivni inhibitor protonske pumpe (IPP) superiorniji od drugih IPP
 - jedini IPP sa najmanjim potencijalom interakcija sa drugim najčešće korištenim lijekovima
- U obliku želučanootpornih tableta od 20 mg:**
- efikasan, siguran i dobro podnošljiv u dugotrajnom liječenju blažih oblika GERB-a
 - lijek izbora u prevenciji gastroduodenalnih ulkusa induciranih primjenom nesteroidnih antireumatika
- U obliku želučanootpornih tableta od 40 mg:**
- u terapijskom pristupu u eradikaciji *Helicobacter pylori* infekcije predstavlja IPP izbora
 - efikasno, sigurno i pouzdano terapijsko rješenje za početni tretman težih oblika GERB-a



Pakovanje:
želučanootporne tablete 28x20mg
želučanootporne tablete 14x40mg

Medicinski Glasnik
Official Publication of the Medical Association of
Zenica-Doboj Canton
Bosnia and Herzegovina

EDITORIAL BOARD

EDITOR-IN-CHIEF

Selma Uzunović-Kamberović
Zenica, Bosnia and Herzegovina

TECHNICAL EDITOR

Harun Drljević
Zenica, Bosnia and Herzegovina

EDITORS

Adem Balić, *Tuzla, Bosnia and Herzegovina*
Dubravka Bartolek, *Zagreb, Croatia*
Branka Bedenić, *Zagreb, Croatia*
Asja Čelebić, *Zagreb, Croatia*
Josip Čulig, *Zagreb, Croatia*
Filip Čulo, *Mostar, Bosnia and Herzegovina*
Jordan Dimanovski, *Zagreb, Croatia*
Branko Dmitrović, *Osijek, Croatia*
Davorin Đanić, *Slavonski Brod, Croatia*
Lejla Ibrahimagić-Šeper, *Zenica, Bosnia and Herzegovina*
Tatjana Ille, *Belgrade, Serbia*
Vjekoslav Jerolimov, *Zagreb, Croatia*
Mirko Šamija, *Zagreb, Croatia*
Ines Drenjančević-Perić, *Osijek, Croatia*
Sven Kurbel, *Osijek, Croatia*
Snježana Pejičić, *Banja Luka, Bosnia and Herzegovina*
Belma Pojskić, *Zenica, Bosnia and Herzegovina*
Asja Prohić, *Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*
Velimir Profozić, *Zagreb, Croatia*
Zlatko Puvačić, *Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*
Radivoje Radić, *Osijek, Croatia*
Amira Redžić, *Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*
Suad Sivić, *Zenica, Bosnia and Herzegovina*
Sonja Smole-Možina, *Ljubljana, Slovenia*
Vladimir Šimunović, *Mostar, Bosnia and Herzegovina*
Adrijana Vince, *Zagreb, Croatia*
Jasmina Vraneš, *Zagreb, Croatia*
Živojin Žagar, *Zagreb, Croatia*

Secretary: Tatjana Žilo;

Proofreaders: Aras Borić (Bosnian, Croatian, Serbian),
Glorija Alić (English),

Cover: Mensur Begičević

MEDICINSKI GLASNIK

Official Publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina

Volume 7, Number 1, February 2010

Free full-text online at: www.ljkzedo.com.ba, and www.doaj.org (DOAJ, Directory of Open Access Journals)

Thematic issue: Genitourinary tract infections

- | | | |
|-------------------------|----|---|
| Review | 1 | Urogenitalne infekcije – antimikrobno liječenje
Urogenital infections – antimicrobial treatment
Višnja Škerk, Alemka Markotić |
| | 12 | Diagnostic methods and techniques in preventing cervical carcinoma Part I: Conventional Cytology and New Cytological Methods
Ines Krivak Bolanča, Jasmina Vraneš |
| | 18 | Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: molecular diagnostics of HPV infection
Adriana Vince, Snježana Židovec Lepej |
| | 26 | Određivanje antimikrobne rezistencije <i>Chlamydia trachomatis</i> i primjena dosadašnjih spoznaja u svakodnevnoj praksi
Determining antimicrobial resistance to <i>Chlamydia trachomatis</i> and applying present findings in daily practice
Sunčanica Ljubin Sternak, Višnja Škerk |
| Original article | 32 | Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum β-lactamase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains in the community
Branka Bedenić, Jasmina Vraneš, Zrinka Bošnjak, Tatjana Marijan, Ana Mlinarić-Džepina, Tamara Kukovec, Jasna Knežević, Maja Anušić, Nataša Belder, Petra Barl, Vladimira Leskovar, Smilja Kalenić |
| | 40 | Antibiotic resistance of coliform bacteria from community-acquired urinary tract infections in the Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina
Selma Uzunović-Kamberović, Mersiha Odobašić, Azra Husković, Aida Hutinović, Nermin Ibranović |
| | 46 | Karakterizacija ESBL-producirajućih sojeva bakterija <i>Escherichia coli</i> i <i>Klebsiella pneumoniae</i> izoliranih iz mokraće izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije
Characterization of ESBL-producing <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains isolated from urine of nonhospitalized patients in Zagreb region
Tatjana Marijan, Vanda Plečko, Jasmina Vraneš, Ana Mlinarić Džepina, Branka Bedenić, Smilja Kalenić |
| | 54 | Rezistencija uropatogenih sojeva bakterije <i>Escherichia coli</i> u trudnica i žena generativne dobi u usporedbi s potrošnjom antibiotika u Zagrebu
Resistance of uropathogenic strains of <i>Escherichia coli</i> in pregnant women and other women in generative ages in comparison with antibiotics consumption in Zagreb
Josip Čulig, Ana Mlinarić-Džepina, Marcel Leppe, Jasmina Vraneš |

- 60 **Značenje mikrobiološke dijagnostike u infekcijama urogenitalnog sustava žena u postmenopauzi**
Evaluation of microbiological diagnostic in urogenital infections in postmenopausal women
Blaženka Hunjak , Zdenka Peršić
- 66 **Zastupljenost bakterija roda *Haemophilus* u uzorcima iz mokraćnog i genitalnog sustava**
Frequency of *Haemophilus* spp. on urinary and and genital tract samples
Vladimira Leskovar, Ana Mlinarić-Džepina, Tatjana Marijan, Jasmina Vraneš
- 72 **Detekcija i tipizacija humanih papiloma virusa metodom polimorfizma restrikcijskih fragmenata u žena s različitim citološkim nalazom**
Detection and typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism in women with different cytology
Lidija Žele-Starčević, Vanda Plečko, Vesna Tripković, Ana Budimir, Branka Bedenić, Zlatko Topalović
- Notes**
- 79 **Infekcije mokraćnog sustava uzrokovane enterobakterijama koje proizvode beta laktamaze proširenog spektra (ESBL) u populaciji na području Primorsko-goranske županije, Hrvatska**
Urinary Tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase (ESBL) – producing enterobacteria in outpatients from Primorsko–Goranska County, Croatia
Brigita Tićac, Nilia Volarević, Kesovija Palmira, Maja Farkaš¹, Dolores Peruč, Silvana Udović-Gobić, Tomislav Rukavina
- 83 **Karakteristike uzročnika urinarnih infekcija povezanih s kateterima u izvanbolničkoj populaciji**
Characteristics of uropathogens in outpatient catheter-associated urinary tract infections
Jasna Knežević, Neda Jarža-Davila, Maja Anušić, Ana Mlinarić-Džepina, Jasmina Vraneš
- 86 **Lokalno liječenje vaginalne infekcije sa kombinacijom nifuratel-nistatin**
Lokal join therapy of vaginal infection by nifuratel-nistatin
Mahira Jahić, Adem Balić, Mahmud Nurkić, Jasmina Dragović, Amela Adžajlić, Amra Habibović, Lejla Mešalić, Aza Žigić

Medicinski Glasnik is indexed by EMBASE (Exerpta Medica), Scopus, Science Citation Index Expanded (SciSearch®), Journal Citation Reports/Science Edition and EBSCO

EDITORIAL

Dear colleagues,

We are happy to have an opportunity to present you with a new issue of Medicinski Glasnik, devoted to cardiovascular system.

The main goal of this issue was to cover various aspects of cardiovascular system, from etiology and epidemiology to physiology and pathophysiology and to clinical presentations of cardiovascular diseases.

Cardiovascular diseases are the main cause of morbidity and mortality in the Western countries. Hypertension and diabetes, together with atherosclerosis (all of which have underlying endothelial dysfunction (Ruzic)) are the main risk factors in etiology of cardiovascular diseases. One example of involvement of immune system in pathophysiology of cardiovascular diseases is atherosclerosis as an inflammatory disease which includes the activation of native immune response via Toll-like receptors (Dzumhur et al) and the other one is in antiphospholipid syndrome which can sometimes be accompanied by acute myocardial infarction (AMI) (Glasnovic et al). Life style (eating habits and obesity, physical activity, smoking, stressful circumstances, personality type (Kozul et al)) has a significant impact on incidence of cardiovascular diseases.

According to the World Health Organization (WHO), in 2001 16.6 million people died of coronary diseases. Prediction of risk factors for occurrence of coronary disease (Martinovic et al), better early diagnosis (e.g. ischemia modified albumin (IMA) as a marker of acute myocardial infarction (AMI) (Gavranovic et al) or utilization of the ratio of exercise and recovery systolic blood pressure integrals in severity of coronary artery disease (Buksa and Mirat), more accurate prognosis of the outcomes of AMI in hypertensive patients (Ivanusa et al), and sometimes complications whose etiology is difficult to determine (Prvulovic et al) are all very important to consider the best treatment options for patients.

Preoperative comorbidities (e.g. hypertension) may significantly influence the conduct of ane-

sthesia and patients' outcome, as shown in the paper by Kvolik et al, chronic pain therapy and hypertension (Rados et al), and importance of continuous education of medical staff and technical equipment in high quality and success of CPR in the paper by Ruzman et al. are all topics of the papers published in this issue.

In this issue we also have several specific topics, such as impairment of tissue perfusion in sepsis (Kvolik et al), and changes in cerebral hemodynamics in parkinsonism (Stenc Bradvica et al). The paper by Marusic et al demonstrates dry diving as a model of pulmonary microembolization. We are also presenting two case-reports on optional treatment with hyperbaric oxygenation in therapy of vascular diseases (Takac et al, Bradvica et al). Haemodynamic changes during tracheal intubation in anaesthetized children might be the important determinants of the selection of anesthesiology procedure (Goranovic et al).

On behalf of the Editorial Board of Medicinski Glasnik we would like to thank to all contributing authors, whose work has helped us to increase the quality of the journal, and ultimately improve understanding of etiology, pathophysiology and physiology of cardiovascular diseases. We invite to enjoy the January 2009 issue of Medicinski Glasnik.

Prof. Ines Drenjancevic-Peric, MD, PhD
Guest Editor

Ass. Prof. Selma Uzunovic-Kamberovic
Editor-in-Chief
Medicinski Glasnik

Urogenitalne infekcije – antimikrobno liječenje

Višnja Škerk, Alemka Markotić

Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Referentni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH za infekcije mokraćnog sustava, Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Urogenitalne infekcije se ubrajaju u najčešće infektivne bolesti ljudi u svijetu. Jedan su od vodećih uzroka akutnih bolesti, kroničnog oštećenja zdravlja i smrtnosti. Spolno prenosive infekcije (SPI) su javnozdravstveni problem radi epidemijske proširenosti, mnogobrojnih komplikacija i trajnih posljedica za zdravlje te radi velikih troškova što ih zdravstveni sustavi i pojedinci izdvajaju za njihovo otkrivanje, sprečavanje i liječenje. Infekcije mokraćnog sustava (IMS) su najčešće bakterijske infekcije ljudi i najčešći su razlog opravdanog propisivanja antibiotika. Sindrom prostatitisa (SP) najčešći je urološki problem u muškaraca mlađih od 50 godina i treći najčešći urološki problem u starijih muškaraca. U ovom radu nisu obuhvaćeni svi problemi koji postoje u antimikrobnom liječenju SPI, IMS i SP, ali su dane osnovne smjernice kojima se većina situacija može obuhvatiti.

Corresponding author:

Višnja Škerk

Klinika za infektivne bolesti

„Dr. Fran Mihaljević“,

Tel.: 385 1 46 03 222

Fax: 385 1 46 03 295

Mirogojska 8, 10 000 Zagreb, Hrvatska

E-mail: vskerk@bfm.hr

Ključne riječi: infekcije mokraćnog sustava, spolno prenosive infekcije, prostatitis, antimikrobno liječenje

Originalna prijava:

08 Septembar 2009.

Prihvaćeno:

09 Decembar 2009.

UVOD

Infekcije mokraćnog i spolnog sustava – urogenitalne infekcije (UGI) se ubrajaju u najčešće infektivne bolesti ljudi u svijetu. Jedan su od vodećih uzroka akutnih bolesti, kroničnog oštećenja zdravlja i smrtnosti. Važan su javnozdravstveni problem spolnog i reproduktivnog zdravlja. UGI najčešće uzrokuju različiti uzročnici za koje je seksualni kontakt važan – iako ne nužno i jedini – način prenošenja te se ubrajaju u spolno prenosive infekcije (SPI). SPI su javnozdravstveni problem radi epidemijske proširenosti, mnogobrojnih komplikacija i trajnih posljedica za zdravlje kao što su neplodnost, spontani pobačaj, zdjelična upalna bolest, izvanmaternična trudnoća, anogenitalni karcinom, kongenitalne infekcije, infekcije novorođenčeta i dojenčeta, smrt, reaktivni artritis, psihičke posljedice, povećana osjetljivost HIV-u i širenje u populaciji te radi golemih troškova što ih zdravstveni sustavi i pojedinci izdvajaju za njihovo otkrivanje, sprečavanje i liječenje (1).

Naziv SPI označava prisutnost potencijalnog uzročnika u organizmu i mogućnost njegova prenošenja na seksualne partnere. Naziv spolno prenosiva bolest (SPB) označava stanje s već zamjetnim simptomima (2).

Procjenjuje se da svake godine više od 400 milijuna odraslih osoba u svijetu oboli od spolno prenosivih bolesti, a da se oko 60% infekcija pojavljuje u osoba mlađih od 25 godina (3). Aktualno stanje SPB u Republici Hrvatskoj je razmjerno povoljno što se može procijeniti prema podacima Epidemiološke službe Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo koja prikuplja izvješća o oboljelima od zaraznih bolesti u cijeloj zemlji (Tablica 1).

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) su najčešće bakterijske infekcije ljudi i najčešći su razlog opravdanog propisivanja antibiotika (4). IMS heterogena su grupa kliničkih sindroma i bolesti od asimptomatske bakteriurije do urosepse (5). Istraživanje IMS u ordinacijama obiteljske

medicine u gradovima RH, što ga je proveo Referentni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske (MZSS) pokazalo je da se tek u oko 33% bolesnika s IMS inicijalno propisuje ciljana antimikrobna terapija prema nalazu izoliranog uzročnika i njegovog antibiograma (6,7). Ta spoznaja ističe potrebu kontinuiranog sustavnog praćenja najčešćih uzročnika IMS te donošenje i redovito obnavljanje smjernica za dijagnostiku i liječenje IMS. Rezistencija *E.coli* u RH na najčešće primjenjivane antibiotike u 2008. godini prikazana je na Tablici 2 (8).

Sindrom prostatitisa (SP) najčešći je urološki problem u muškaraca mlađih od 50 godina i treći najčešći urološki problem u starijih muškaraca. Prevalencija SP u muškaraca u dobi od 24-74 godine iznosi približno 10%. SP utječe na kvalitetu života bolesnika u jednakoj mjeri kao bolest koronarnih arterija ili Chronova bolest, a na zdravlje bolesnika u jednakoj mjeri utječe kao šećerna bolest ili kongestivno srčano zatajenje (9).

ANTIMIKROBNO LIJEČENJE SPOLNO PRENOŠIVIH INFEKCIJA

Ni jedna SPI ne smije se promatrati kao izdvojen problem, jer su česte istodobne infekcije različitim uzročnicima (2,3,10). Uzročnici SPI su mnogobrojni: bakterije *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, virusi (virus humane imunodeficijencije, humani papiloma virus, virus B hepatitisa, herpes simpleks virus, te citomegalovirus), paraziti (uzročnici svraba i stidne uši), protozoa (vaginalni trihomonas) i gljive (kandida). Lijek koji rabimo u liječenju SPI treba zadovoljavati kriterije Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)

Tablica 2. Rezistencija *E.coli* na najčešće primjenjivane antibiotike u Hrvatskoj u 2008. godini (Preuzeto iz: Tambić T, Tambić Andrašević A. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009.

Antibiotik	Rezistencija (intermedijarna osjetljivost) % n=15760
nitrofurantoin	2 (0)
trimetoprim/sulfametoksazol	24 (1)
amoksicilin	49 (0)
cefaleksin	8 (3)
koamoksiklav	4 (3)
cefuroksim	4 (0)
ceftributen	3 (0)
ceftriakson	3 (0)
gentamicin	6 (0)
norfloksacin	11 (0)
ciprofloksacin	11 (0)

Tablica 1. Spolno prenosive bolesti u Hrvatskoj*

Bolest	Broj novootkrivenih bolesnika tokom godine	
	2007.	2008.
Sifilis	31	31
Gonoreja	15	10
Hepatitis B	136	126
Klamidijska infekcija	374	549
HIV/AIDS	47/10	52/17

*Podaci Epidemiološke službe Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo

Tablica 3. Liječenje genitalnog herpesa – prva klinička epizoda

ACIKLOVIR	3x400 mg p.o./ 7-10 dana ili
ACIKLOVIR	5x200 mg p.o./7-10 dana ili
FAMCIKLOVIR	3x250 mg p.o./ 7-10 dana ili
VALACIKLOVIR	2x1,0 g p.o./ 7-10 dana
Istovremeno liječenje samo simptomatskog seksualnog partnera	

a to su: 1. visoka djelotvornost (najmanje 95% mikrobiološke učinkovitosti), 2. niska cijena, 3. prihvatljiva toksičnost i podnošljivost, 4. mala mogućnost poticanja razvoja rezistencije uzročnika na antimikrobna sredstva, 5. jednokratna primjena, 6. peroralna primjena i 7. mogućnost primjene kod trudnica (2). Poželjno je da lijek koji se upotrebljava u liječenju SPI bude učinkovit kod simptomatskog i asimptomatskog tijeka SPI, da njegova primjena minimalno utječe na način života bolesnika, da postoji mala mogućnost slučajnog propuštanja uzimanja lijeka, te da je aktivan na više različitih uzročnika SPI (2,3).

Genitalni herpes

Genitalni herpes (GH) je kronična doživotna virusna infekcija i jedna je od najučestalijih SPI. Smatra se da preko 50 milijuna ljudi u SAD-u boluje od genitalnog herpesa. Uzrokuju ga herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) i HSV tip 2 (HSV-2). Većinu rekurentnih epizoda genitalnog herpesa uzrokuje HSV-2 dok je oko 50% primarnih infekcija uzrokovano s HSV-1. Inkubacija primarne infekcije iznosi 2-7 dana. Recidivi se pojavljuju u gotovo polovice oboljelih od genitalnog herpesa, a broj im varira od 3 do više od 10 na godinu. Genitalni herpes visoko je kontagiozan u aktivnoj fazi, no infekcija se prenosi i od osoba s blagom i neprepoznom pa i asimptomatskom infekcijom koje intermitentno luče virus.

Prvu kliničku epizodu genitalne infekcije herpes simpleks virusom uvijek treba liječiti (Tablica 3) (2,3,11). Liječiti treba i bolesnike s blagom kliničkom slikom jer u protivnom mogu kasnije dobiti teške i prolongirane epizode. Rekurentne epizode genitalnog herpesa liječe se prema procjeni težine kliničke slike (Tablica 4) (2,3,11). Supresivna terapija za rekurentni genitalni herpes provodi se

Tablica 4. Liječenje rekurentne epizode genitalnog herpesa

ACIKLOVIR	3x400 mg p.o./ 5 dana ili
ACIKLOVIR	2x800 mg p.o./ 5 dana ili
ACIKLOVIR	3x800 mg p.o./ 2 dana ili
FAMCIKLOVIR	2x125 mg p.o./ 5 dana ili
FAMCIKLOVIR	2x1000 mg p.o./ 1 dan ili
VALACIKLOVIR	2x500 g p.o./ 3 dana ili
VALACIKLOVIR	1x1,0 g p.o./ 5 dana
Istovremeno liječenje samo simptomatskog seksualnog partnera	

Tablica 5. Supresivna terapija rekurentnog genitalnog herpesa

ACIKLOVIR	2x400 mg p.o. ili
FAMCIKLOVIR	2x250 mg p.o. ili
VALACIKLOVIR	1x500 g p.o. ili
VALACIKLOVIR	1x1,0 g p.o.
Istovremeno liječenje samo simptomatskog seksualnog partnera	

u osoba koje imaju ≥ 6 epizoda genitalnog herpesa u jednoj godini (Tablica 5) (2,3,11). Liječenje genitalnog herpesa treba započeti što ranije, optimalno u prvih 24 sata od pojave kliničkih simptoma. Primjenjuju se aciklovir, njegov prolijevak valaciklovir, te famciklovir. Ti lijekovi ne eradiciraju latentan virus niti djeluju na učestalost i težinu rekurentnih epizoda u času kada se lijek prestaje davati. Lokalna terapija se pokazala slabo djelotvornom. Asimptomatskog seksualnog partnera se ne liječi (3,11).

Terapijski postupci u liječenju genitalne infekcije ljudskim papilomavirusima (HPV) su oni u kojima bolesnik sam primjenjuje preparat (podofilox ili imiquimod) i oni u kojima aktivnu ulogu imaju zdravstveni djelatnici (krioterapija, podofilin, trikloroctena kiselina ili bikloroctena kiselina, kirurško odstranjenje, laser, infekcije interferona u mjesto lezije). Primjenom HPV cjevica proporcionalno broju cijepljenih, očekuje se prevencija najvažnijih bolesti povezanih s HPV infekcijom.

Negonokokni uretritis i mukopurulentni cervicitis

Ovo su najčešće kliničke manifestacije spolno prenosive infekcije uzrokovane sa vrstom *Chlamydia trachomatis*. Asimptomatska klamidijaska infekcija česta je u oba spola, kod 70% inficiranih žena i 50% inficiranih muškaraca. Asimptomatski inficirane osobe glavni su izvor infekcije u populaciji.

Akutni uretritis očituje se polakizurijom, dizurijom, ejakulatornim tegobama i uretrorejom mukopurulentnog ili purulentnog iscjeka. Upute za liječenje prikazane su u Tablici 6 (2,3,11). *C. trachomatis* uzrokuje 10-55% negonokoknih uretritisa (NGU). Uzročnici NGU nadalje su *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*,

Tablica 6. Liječenje akutnog negonokoknog uretritisa/ mukopurulentnog cervicitisa

AZITROMICIN	1,0 g p.o. jednokratno ili
DOKSICIKLIN	2x100 mg p.o./ 7 dana ili
ERITROMICIN	baza 4x500mg p.o./ 7 dana ili
ERITROMICIN	etilsukcinat 4x800 mg p.o./ 7 dana ili
OFLOKSACIN	2x300 mg p.o./ 7 dana ili
LEVOFLOKSACIN	1x500 mg p.o./ 7 dana
Istovremeno liječenje seksualnog partnera	

Tablica 7. Rekurentni i perzistentni uretritis

METRONIDAZOL 1x2,0 g p.o. jednokratno ili
TINIDAZOL 1x2,0 g p.o. jednokratno +
AZITROMICIN 1x1,0 g p.o. jednokratno
 TJEDNO, TIJEKOM 3 TJEDNA
 Istovremena kontrola i liječenje seksualnog partnera

Trichomonas vaginalis, HSV, adenovirusi, a rjeđe i enterobakterije. Komplikacije NGU u muškaraca su epididimitis, prostatitis i Reiterov sindrom. Oko 50% muškaraca s kroničnim nebakterijskim prostatitisom i sindromom kronične boli u zdjelici bez dokazljive infekcije imaju upalu uretre bez identifikacije infektivnog uzročnika. U ovim je slučajevima uz metronidazol ili tinidazol potrebno primijeniti azitromicin 1x1,0 g p.o. tjedno kroz 3 tjedna, ukupno 3,0 grama (Tablica 7) (12).

Mukopurulentni cervicitis (MPC) kojeg najčešće uzrokuje *C. trachomatis*, predstavlja ekvivalent negonokoknom uretritisu u muškarca (Tablica 6 i 8) (2,3,11). Širenje SPI iz endocerviksa u gornji dio spolnog sustava žene može dovesti do zdjelice upalne bolesti i do njezinih posljedica na plodnost, primjerice biti uzrokom ektopične trudnoće i infertiliteta. Uzorci za dokaz urogenitalne klamidijske infekcije su u žene obrisak endocerviksa ili uretre, te urin, a u muškarca obrisak uretre, urin, eksprimat prostate ili ejakulat. Kod sumnje na rektalnu infekciju uzima se obrisak rektuma. Metode dokaza *C. trachomatis* su kultura, direktna imunofluorescencija, enzimatski imunotest, hibridizacija nukleinskih kiselina i test amplifikacije nukleinskih kiselina (NAAT) koji je najosjetljiviji test.

Osobe koje se liječe od klamidijske infekcije i njihovi seksualni partneri moraju se suzdržavati od spolnih odnosa do kraja terapije ako su liječeni 7 dana, odnosno 7 dana nakon što su popili jednokratno 1,0 g azitromicina. Bakteriološka kontrola provedenog liječenja klamidijske infekcije treba se učiniti 3-4 tjedna nakon provedenog liječenja u trudnica, ako je provedena terapija bila neadekvatna i nekompletna, kod perzistencije kliničkih simptoma i kod moguće reinfekcije.

Tablica 8. Liječenje infekcije *C. trachomatis* u trudnici

AZITROMICIN 1,0 g p.o. jednokratno ili
ERITROMICIN baza 4x500 mg p.o./ 7 dana ili
ERITROMICIN baza 4x250 mg p.o./14 dana ili
ERITROMICIN etilsukcinat 4x800 mg p.o./ 7 dana ili
ERITROMICIN etilsukcinat 4x400 mg p.o./ 14 dana ili
AMOKSICILIN 3x500 mg p.o./ 7 dana*
 Istovremeno liječenje seksualnog partnera

*bakteriološka djelotvornost < 60%; na kulturi tkiva penicilin potiče nastanak perzistentnih oblika klamidije

Tablica 9. Liječenje nekomplikirane gonokokne infekcije cerviksa, uretre i rektuma

CEFIKSIM 400 mg p.o. jednokratno ili
CEFTRIAKSOM 125 mg IM jednokratno ili
CIPROFLOKSACIN 500 mg p.o. jednokratno ili
OFLOKSACIN 400 mg p.o. jednokratno ili
LEVOFLOKSACIN 250 mg p.o. jednokratno +
 ako klamidijska infekcija nije isključena
AZITROMICIN 1,0 g p.o. jednokratno ili
DOKSICIKLIN 2x100 mg p.o./ 7 dana
 Istovremena kontrola i liječenje seksualnog partnera

Rezultat kontrolne pretrage učinjene u razdoblju < 3 tjedna nakon završene terapije može biti lažno negativan zbog malog broja klamidija u perzistentnoj klamidijskoj infekciji ili lažno pozitivan zbog prisutnosti uginulih klamidija.

Druge infekcije

Gonoreja je zarazna spolna bolest uzrokovana bakterijom *Neisseria gonorrhoeae*, i koja prvenstveno zahvaća urogenitalne sluznice, a znatno rjeđe i druge organe. U svijetu od gonoreje godišnje oboli 25 milijuna ljudi. U 50% žena infekcija je asimptomatska (Tablica 9) (13).

Sifilis je kronična zarazna bolest uzrokovana spirohetom *Treponema pallidum*. Bolest se najčešće prenosi spolnim kontaktom, rjeđe transplacentarno od zaražene majke na plod, a danas iznimno rijetko transfuzijom ili slučajnom inokulacijom. Lijek prvog izbora za liječenje sifilisa je penicilin. U osoba preosjetljivih na penicilin preporuča se desenzibilizacija. Kod trudnica preosjetljivih na penicilin dolazi u obzir azitromicin 500 mg p.o./1 puta dnevno tijekom 10 dana. Potrebna je istovremena kontrola i liječenje seksualnog partnera (14).

Bakterijska vaginoza je polimikrobni klinički sindrom koji označava neravnotežu između smanjenog broja laktobacila i povećanog broja anaeroba, posebno *Gardnerella vaginalis*, te *Mycoplasma hominis*. Najčešća je vaginalna infekcija u žena reproduktivne dobi. Povećava rizik od zdjelice upalne bolesti nakon histeroskopije ili kiretaže, a tijekom trudnoće povećava rizik od prijevremenog porođaja. Liječenje metronidazolom 2x500 mg p.o./7 dana ili klindamicinom 2x300 mg p.o./ 7 dana je uspješnije od lokalne primjene metronidazola ili

Tablica 10. Liječenje trihomonijaze

METRONIDAZOL 2 g p.o. – jednokratno ili
TINIDAZOL 2 g p.o. – jednokratno ili
METRONIDAZOL 2x500 mg p.o./ 7 dana ili
ZA PROSTATITIS: METRONIDAZOL 2 x 1g p.o. / 14 dana
 Istovremeno liječenje seksualnog partnera

Tablica 11. Liječenje komplicirane-rekurentne vulvovaginalne kandidijaze

STANDARDNA LOKALNA TERAPIJA - 7-14 dana ili
FLUKONAZOL 1., 4., 7. dan 100-200 mg p.o.
SUPRESIVNA TERAPIJA 6-12 mjeseci
 intravaginalno azoli ili acidi borici – svaku treću večer ili
FLUKONAZOL ili **ITRAKONAZOL** jednom tjedno
 Upute o rutinskom istovremenom liječenju asimptomatskog
 partnera su kontroverzne. Liječiti treba simptomatskog partnera

klindamicina (3). Jednokratna primjena metronidazola 1x2,0 g p.o. se više ne preporučuje radi slabe djelotvornosti. Intravaginalna primjena laktobacila nije uspješna za liječenje bakterijske vaginoze. Liječenje seksualnog partnera nije obavezno.

Trihomonijaza je urogenitalna infekcija uzrokovana bičastim protozoonom, *Trichomonas vaginalis*. U žena se očituje kao vaginitis, cervicitis, uretritis i cistitis, a u muškaraca uzrokuje 5-10% svih uretritisa. Rijetke komplikacije u muškaraca su epididimitis i prostatitis. Liječi se metronidazolom ili tinidazolom peroralno. Djelotvornost intravaginalnog liječenja je slabija od peroralnog. Radi relativne rezistencije vaginalnog trihomonasa kod neuspjeha jednokratne terapije od 2,0 g p.o., doza se može povećati, a liječenje produžiti. U liječenju prostatitisa metronidazol se dozira 2x1,0 g p.o. tijekom 2 - 4 tjedna. Potrebno je istovremeno liječenje seksualnog partnera (Tablica 10) (2,3,11).

Kandidoza je klinički uočljivo prekomjerno bujanje komenzalne krasnice na sluznici vagine i penisa. Uglavnom se ne prenosi spolnim putem. Nekomplicirana vulvovaginalna kandidoza – sporadična ili rijetka, klinički blaga do umjerenno teška, najčešće uzrokovana vrstom *Candida albicans* liječi se 1-3-7-14 dana lokalno klotrimazolom, mikonazolom, ketokonazolom ili nistatinom ili peroralno jednokratnom primjenom flukonazola 1x150 ili s itrakonazolom 2x200 mg kroz jedan dan.

Komplicirana vulvovaginalna kandidoza – rekurentna, koja se javlja 4 i više puta godišnje, klinički teška, uzrokovana najčešće vrstama

Tablica 12. Liječenje zdjelične upalne bolesti

Parenteralna terapija pa "switch" – ukupno 14 dana
KLINDAMICIN + GENTAMICIN ili
OFLOKSACIN ili **LEVOFLOKSACIN + METRONIDAZOL**
 ili
AMPICILIN/ SULBAKTAM + DOKSICIKLIN
AMOKSICILIN/KLAVULANSKA
KISELINA+AZITROMICIN*
CEFOTETAN[†] ili **CEFOKSITIN[†] + DOKSICIKLIN**
 Istovremena kontrola i liječenje seksualnog partnera

*vidi tablicu 14; [†]nisu registrirani u RH,

Tablica 13. Liječenje zdjelične upalne bolesti

Oralna terapija – 14 dana
OFLOKSACIN ili **LEVOFLOKSACIN + METRONIDAZOL** ili
CEFTRIAKSON IM jednokratno + **DOKSICIKLIN + METRONIDAZOL** ili
AMOKSICILIN/KLAVULANSKA
KISELINA+AZITROMICIN*
 Istovremena kontrola i liječenje seksualnog partnera

* vidi tablicu 14

Candida non- albicans, javlja se u žena s nekontroliranim dijabetesom, mentalnom retardacijom, imunosupresijom ili u trudnica. Liječi se lokalno ili peroralno dulje od nekomplicirane kandidoze (Tablica 11) (3,11). Liječiti treba samo simptomatskog seksualnog partnera.

Zdjelična upalna bolest klinički je sindrom povezan s uzlaznim širenjem mikroorganizama iz rodnic. Širokog je spektra kliničkih manifestacija od supkliničkog endometritisa do piosalpinska i tuboovarijskog apscesa. Infekcija je najčešće polimikrobna. *C. trachomatis* ima važnu ulogu u etiologiji i najvažniji je uzrok sprečivog infertiliteta (Tablice 12 i 13) (2,3,11).

Novi pogled na primjenu azitromicina u liječenju spolno prenosivih infekcija

Dvadesetak godina je prošlo od prve registracije tada novog antimikrobnog lijeka azitromicina. Ispitan je u nizu kontroliranih kliničkih studija, primalo ga je više milijuna bolesnika, pokazao se djelotvoran prema brojnim uzročnicima različitih kliničkih sindroma, razmotrene su i otklonjene predrasude i nedoumice o njegovoj primjeni. Kliničkom primjenom azitromicina postignut je svjetskim razmjerima bitan napredak u liječenju SPI. Danas je međutim jasno da u SPI postoje indikacije u kojima je jednokratna primjena od 1,0 g azitromicina nedostatna, te se doza i duljina primjene moraju mijenjati (Tablica 14) (15,16).

ANTIMIKROBNO LIJEČENJE INFEKCIJA MOKRAČNOG SUSTAVA

Prema Infectious Diseases Society of America (IDSA) i European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) infekcije mokraćnog sustava (IMS) se dijele na: akutni nekomplicirani cistitis žena, akutni nekomplicirani pijelonefritis žena, komplicirane IMS i IMS muškaraca, asimptomatska bakteriurija i rekurentne IMS (reinfekcije i relapsi) (17,18).

Tablica 14. Preporuke za primjenu azitromicina u spolno prenosivim infekcijama

Indikacija	AZITROMICIN: doza i duljina liječenja
akutni negonokokni uretritis/cervicitis asimptomatski seksualni partneri	1 x 1,0 g p.o. jednokratno
perzistentna klamidijska infekcija rekurentni i perzistentni uretritis*	1 x 1,0 g p.o. tjedno/ 3 tjedna (ukupno 3,0 g)
zdjelična upalna bolest [†]	1 x 1,0 g p.o. – 3 dana zaredom, ili 1 x 500 mg p.o. – 3 dana u tjednu / 3 tjedna ukupno (4,5 g) ili 1 x 1,0 g p.o. tjedno/3 tjedna (ukupno 3,0 g) ili 500 mg i.v./1-2 dana; nastaviti sa 1x250 mg p.o. do ukupno 7 dana liječenja
prostatitis akutni, kronični, asimptomatski (<i>C.trachomatis</i> , <i>U.urealyticum</i>)	1 x 500 mg p.o.– 3 dana u tjednu/ 3 tjedna (ukupno 4,5 g), ili 1 x 1,0 g p.o. tjedno/ 4 tjedna (ukupno 4,0 g)
postvenerični reaktivni artritis i Reiterov sindrom posredovan <i>C. trachomatis</i>	1 x 1,0 g p.o. /tjedno/ 3 tjedna (ukupno 3,0 g)

* plus metronidazol; [†]plus metronidazol, plus betalaktam ili aminoglikozid

Dijagnoza IMS zasniva se na kliničkim simptomima i laboratorijskim nalazima. Neki od tih kliničkih simptoma upućuju ujedno i na infekciju genitalnog trakta. Dizurija (otežano bolno mokrenje), polakizurija (učestalo mokrenje malih količina mokraće), urgencija mokrenja i inkontinencija nastaju zbog nadražaja sluznice mokraćnog mjehura i uretre. Akutna dizurija žene može biti znak bakterijskog cistitisa, kolpitis uzrokovana kandidom, trihomonomom ili herpes simpleks virusom i uretritisa uzrokovana raznim uzročnicima spolno prenosivih infekcija.

Kod IMS urin je taman, gust, neugodna mirisa, povremeno krvav. Kod uretritisa javlja se uretralni iscjedak koji je lakše uočljiv u muškaraca.

Povišena tjelesna temperatura s tresavicama te mukoza bol lumbalna, često lokalizirana uz epigastrij sa širenjem u donji dio trbuha znak su pijelonefritisa, kao i nikturija (učestalo noćno mokrenje) i poliurija (izlučivanje povećanih količina mokraće) koje nastaju zbog oslabljene koncentracijske sposobnosti bubrega. Jaka lumbalna bol sa širenjem prema preponama znak je opstrukcijske bolesti. Kod pijelonefritisa mogu biti izraženi i simptomi afekcije donjeg dijela urotrakta. U starijih osoba s pijelonefritisom češće su zastupljeni samo opći simptomi, a katkad i inkontinencija urina.

Bol u preponama i perinealna bol znak su prostatitisa. Akutni bakterijski prostatitis manifestira se

općim simptomima infekta, visokom temperaturom, učestalim, bolnim i urgentnim mokrenjem, nekad i kompletnom retencijom mokraće, te otečenom i bolnom prostatom. Simptomi akutnog prostatitisa traju do 3 mjeseca. Ukoliko su uzročnici akutnog bakterijskog prostatitisa *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus agalactiae* i *Enterococcus*, klinička slika nije burna, a dominiraju uretralni i prostatički simptomi te seksualni poremećaji.

Kronični se prostatitis očituje simptomima od strane mokraćne cijevi i mokraćnog mjehura (učestalo, otežano, urgentno, noćno mokrenje, pečenje kod mokrenja, tanak isprekidan mlaz, uretralni iscjedak); simptomima od strane prostate (neugoda, pritisak, bol u perineumu, preponama, donjem dijelu trbuha i leđa, napetost u predjelu testisa i epididimisa, anorektalna osjetljivost); seksualnim poremećajima (otežana erekcija, bolna ejakulacija) i drugim simptomima poput mijalgije, glavobolje, slabosti, subfebriliteta.

Uzorak urina za analizu uzima se od prvog jutarnjeg urina ili nakon što bolesnik barem četiri sata nije mokrio, najčešće metodom čistog srednjeg mlaza, znatno rjeđe urinarnim kateterom ili suprapubičnom punkcijom. Čisti srednji mlaz urina uzima se nakon uobičajene toaleta spolovila ili pranja spolovila sterilnom fiziološkom otopinom. Urin treba nasaditi na hranjive podloge unutar dva sata, a ako to nije moguće uzorak urina može stajati na +4 °C do 24 sata.

Na IMS upućuju leukociturija i bakteriurija, a povremeno se susreće hematurija, češće terminalna kao znak hemoragičnog cistitisa i proteinurija do najviše 2 g u 24-satnom urinu.

Povećan broj leukocita u mokraći može biti uzrokovan prisutnošću urinarnog katetera, kamencima, vulvovaginitisom, erozijama u vagini i cerviksu ili dehidracijom.

Bakteriurija je naziv za rast i umnožavanje bakterija u mokraći. Za dokaz bakteriurije najbolja je metoda kultivacije ispravno uzetog uzorka mokraće, brojenje bakterija u 1 mL mokraće i ispitivanje njihove osjetljivosti na razna antimikrobna sredstva. U 95% uzoraka mokraće bolesnika sa nekomplikiranim IMS izolira se samo jedna vrsta bakterija, a u 5% izoliraju se dvije ili više vrsta. Urin je normalno sterilan, no distalni dio uretre je koloniziran saprofitnom florom susjednih regija

te uzorak izmokrenog urina može biti kontaminiran tim mikroorganizmima.

Pojam "signifikantna bakteriurija" označava broj bakterija po 1 mL mokraće kojim se želi razgraničiti značajna, patološka bakteriurija kao znak IMS od kontaminacije mokraće prolazom kroz distalni dio uretre. Klasičan kriterij signifikantne bakteriurije kojim se s 95% vjerojatnosti određuje postojanje IMS je $\geq 10^5$ bakterija/mL mokraće. Danas važeći kriteriji za signifikantnu bakteriuriju su administrativno postavljeni uvažavajući mogućnost da kod nekih kategorija IMS i manji broj bakterija može biti značajan (Tablica 15) (19,20).

Test nitrita brzi je skrining test za dokaz bakteriurije „dipstick“ metodom. Lažno negativan test dat će bakterije koje ne reduciraju nitrate (stafilokoki, enterokoki, pseudomonas).

Cilj antimikrobnog liječenja IMS je nestanak kliničkih simptoma i eradikacija infekcije u svrhu prevencije nastanka rekurirajućih epizoda. Liječe se sve simptomatske IMS i asimptomatske u odabranih osoba.

Antimikrobno liječenje IMS mora biti potrebno, učinkovito, usmjereno prema pretpostavljenom ili dokazanom uzročniku infekcije, što jednostavnije, što jeftinije, što užeg spektra djelovanja, što manjeg utjecaja na normalnu floru crijeva, mora se primijeniti u optimalnoj dozi i dovoljno dugom razdoblju za eradikaciju uzročnika. Djelotvornost primijenjenog antimikrobnog lijeka korelira s njegovom inhibitornom koncentracijom u urinu. Koncentracije mnogih antimikrobnih lijekova mnogo su više u mokraći od odgovarajućih koncentracija u drugim tkivnim tekućinama pa mogu doseći minimalnu inhibitornu koncentraciju nekih rezistentnih *in vitro* mikroorganizama. Za liječenje urosepse, pijelonefritisa i kompliciranih IMS važne su serumske koncentracije anti-

mikrobnih lijekova te koncentracije u bubregu i prostati (20,21).

U bolesnika s bubrežnom insuficijencijom potrebno je modificirati dozu antimikrobnih lijekova koji se primarno izlučuju bubregom te se iz organizma ne mogu odstraniti drugim mehanizmima. Insuficijentni bubrezi neće moći koncentrirati antimikrobni lijek u mokraći što će rezultirati otežanom eradikacijom bakteriurije. To je i razlog neuspjeloj terapiji urinarnih infekcija aminoglikozidima u bolesnika s renalnom insuficijencijom. Minimalnu inhibitornu koncentraciju aminoglikozida za gram-negativne bakterije u urinu povisit će visoke koncentracije kalcija i magnezija te nizak pH urina. U bolesnika s bubrežnom insuficijencijom sredstva su prvog izbora za liječenje IMS betalaktamski antibiotici.

Ove upute za antimikrobno liječenje IMS donešene su na temelju proučene opsežne stručne i znanstvene medicinske literature, iskustava u dugogodišnjem kliničkom radu s bolesnicima s IMS, nacionalnih smjernica za liječenje i profilaksu IMS, rezultata praćenja rezistencije na antibiotike što ga kontinuirano provodi Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike koji djeluje pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske, primjedaba što su ih kolege liječnici dali na Tečajevima trajne edukacije što ih kontinuirano provodimo preko 4 godine u gradovima Republike Hrvatske (20-25).

Akutni nekomplikirani cistitis žene

Liječenje sporadične epizode akutnog nekomplikiranog cistitisa žene u premenopauzi, koja nije trudnica započinje se na temelju kliničkih simptoma i leukociturije. Urinokultura nije potrebna. Antimikrobna terapija je empirijska. Preporuke su date u Tablici 16 (20).

Akutni nekomplikirani pijelonefritis

Bolesnike s akutnim pijelonefritisom treba zbog težine općeg stanja često hospitalizirati. Potrebno je osigurati dobru hidraciju i analgoantipiretike

Tablica 15. Kriteriji signifikantne bakteriurije za različite kategorije infekcije mokraćnog sistema

Broj bakterija po mL čistog srednjeg mlaza urina	Kategorija IMS
$\geq 10^3$	akutni nekomplikirani cistitis žene
$\geq 10^4$	akutni nekomplikirani pijelonefritis žene
$\geq 10^5$ u žena $\geq 10^4$ u muškaraca	komplikirane IMS
$\geq 10^5$ identičnih bakterija u dva uzastopna uzorka urina u ≥ 24 sata-u žena $\geq 10^5$ u muškaraca	asimptomatska bakteriurija

Tablica 16. Antimikrobno liječenje akutnog nekomplikiranog cistitisa žene

NITROFURANTOIN 2-3x100mg p.o. / 7 dana
KOAMOKSIKLAV 2x1,0g p.o. / 7 dana
CEFALEKSIN 2x1,0g p.o. / 7 dana
NORFLOKSACIN 2x400mg p.o. / 3 dana

Tablica 17. Antimikrobno liječenje akutnog nekomplikiranog pijelonefritisa žene

<p>Ambulantno liječenje KOAMOKSIKLAV 2x1g p.o. / 10-14 dana CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim aksetil 2x500mg p.o./ 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE Cefiksini ili Cefitibuten 1x400mg p.o./ 10-14 dana CIPROFLOKSACIN 2x500mg p.o./ 7-10 dana</p>
<p>Bolničko liječenje (započeti parenteralno, nastaviti p.o.) KOAMOKSIKLAV 3x1,2g IV zatim p.o. / 10-14 dana CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim 3x750-1500mg IV/ 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE Ceftriakson 1 x 1-2 g IV ili IM, zatim p.o. / 10-14 dana GENTAMICIN 2-5mg/kg IV ili IM podijeljeno u 1-3 dnevne doze / 10 dana Cefalosporini II i III generacije i koamoksiklav mogu se primijeniti sami ili u kombinaciji s gentamicinom CIPROFLOKSACIN 2x200-400mg IV, zatim p.o. / 7-10 dana</p>

po potrebi. Za liječenje pijelonefritisa preporučuje se što prije staviti infekciju pod kontrolu visokim dozama parenteralnih antibiotika i time spriječiti ireverzibilno oštećenje samog bubrega, pa zatim relativno rano (24-72 sata od postizanja afebrilnosti) prijeći na peroralnu primjenu prikladnog antibiotika. Bolesnice s blažom kliničkom slikom pijelonefritisa koje mogu peroralno uzeti antimikrobni lijek, liječe se ambulantno. Kod pijelonefritisa obavezno je prije započete antimikrobne terapije učiniti urinokulturu. Terapija se vrlo često započinje kao empirijska, a kasnije se usklađuje prema nalazu urinokulture. Preporuke se nalaze na Tablici 17 (20).

Komplikirane infekcije mokraćnog sustava

Komplikirane IMS su IMS u osoba koje imaju bolest ili stanje koje omogućuje propagaciju infekcije, a otežava njeno izlječenje (Tablica 18) (20).

U Tablicama 19 - 22 prikazane su preporuke za

Tablica 18. Čimbenici koji infekcije mokraćnog sustava čine komplikiranom

<p>muški rod trudnoća bolnički akvirirana IMS prisutnost urinarnog katetera ili drugog stranog tijela uretera, uretre ili bubrega intermitentna kateterizacija mokraćnog mjehura vezikoureteralni refluksi i druge funkcionalne ili anatomske abnormalnosti urinarnog trakta (rezidualni urin nakon mokrenja >100 mL; kemijske ili radijacijske ozljede uropitela; obstruktivna uropatija bilo koje etiologije uključujući obstrukciju vrata mokraćnog mjehura, neurogeni mokraćni mjehur, kamence, tumore; postoperacijske anomalije urotakta) bubrežna insuficijencija i transplantacija intervencija na urotaktu unatrag 15 dana uzimanje antibiotika unatrag 3 mjeseca trajanje simptoma IMS dulje od 7 dana šećerna bolest imunosupresija</p>
--

Tablica 19. Antimikrobno liječenje infekcije mokraćnog sustava muškaraca

<p>Ambulantno liječenje Febrilna IMS bez simptoma i znakova prostatitisa CIPROFLOKSACIN 2x500mg p.o. / 14 dana KOAMOKSIKLAV 2x1,0g p.o. / 14 dana CEFUROKSIM-AKSETIL 2x500mg p.o. / 14 dana Febrilna IMS sa simptomima i znakovima prostatitisa CIPROFLOKSACIN 2x500mg p.o. / 4 tjedna KOTRIMOKSAZOL 2x960mg p.o. / 4 tjedna ... ako je prethodno poznata osjetljivost uzročnika KOAMOKSIKLAV 2x1,0g p.o. / 4 tjedna CEFUROKSIM-AKSETIL 2x500mg / 4 tjedna</p>
<p>Bolničko liječenje (započeti parenteralno i nastaviti p.o. identičnim lijekom ili kotrimoksazolom ako je poznata osjetljivost uzročnika) Febrilna IMS bez simptoma i znakova prostatitisa liječi se 14 dana, a sa simptomima i znakovima prostatitisa 4 tjedna CIPROFLOKSACIN 2x400mg IV KOAMOKSIKLAV 3x1,2g IV CEFUROKSIM 3x1,5g IV CEFTRIAKSON 1x2,0g IV</p>

antimikrobno liječenje IMS muškaraca, trudnica, osoba s trajnim urinarnim kateterom i drugim stranim tijelima urotakta, te IMS u osoba s funkcionalnim i anatomske abnormalnostima urotakta (20,26,27).

U bolesnika s komplikiranim IMS obavezno se treba prije započete antimikrobne terapije učiniti urinokultura prema čijem će se rezultatu naknadno evaluirati empirijski započeta terapija.

Važno je utvrditi i pokušati ukloniti ili barem staviti pod kontrolu čimbenike koji IMS čine komplikiranom.

Asimptomatska bakteriurija

Liječi se prema antibiogramu u osoba u kojih predskazuje nastanak simptomatske IMS i kada može dovesti do tihog oštećenja bubrega. Ne li-

Tablica 20. Antimikrobno liječenje infekcije mokraćnog sustava trudnica

<p>Akutni cistitis Asimptomatska bakteriurija (prema antibiogramu) CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim-aksetil 2x500mg p.o. / 7 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE Cefitibuten 1x400mg p.o. / 7 dana KOAMOKSIKLAV 2x1,0 g p.o./ 7 dana NITROFURANTOIN samo u I i II trimestru 2-3x100mg p.o./ 7 dana</p>
<p>Pijelonefritis Ambulantno liječenje CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim-aksetil 2x500mg p.o. / 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE Cefitibuten 1 x 400 mg p.o./ 10-14 dana KOAMOKSIKLAV 2x1,0g p.o./ 10-14 dana Bolničko liječenje (započeti parenteralno i nastaviti p.o.) CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim 3x750-1500mg IV / 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE 10-14 dana KOAMOKSIKLAV 3x1,2g IV/ 10-14 dana</p>

Tablica 21. Antimikrobno liječenje infekcije mokraćnog sustava u osoba s funkcionalno i anatomske abnormalnim urotaktom

Ambulantno liječenje
CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim-aksetil 2x500mg p.o./ 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE Cefitibuten ili Cefiksime 1x400 mg p.o./ 10-14 dana KOAMOKSIKLAV 2x1g p.o./ 10-14 dana CIPROFLOKSACIN 2x500mg p.o./ 7-10 dana
Bolničko liječenje (započeti parenteralno, nastaviti p.o.)
CEFALOSPORINI II GENERACIJE Cefuroksim 3x750-1500mg IV/ 10-14 dana CEFALOSPORINI III GENERACIJE IV ili IM, zatim p.o. / 10-14 dana KOAMOKSIKLAV 3x1,2g IV zatim p.o. / 10-14 dana GENTAMICIN 2-5mg/kg IV ili IM podijeljeno u 1-3 dnevne doze / 10 dana Cefalosporini II i III generacije i koamoksiklav mogu se primijeniti sami ili u kombinaciji s gentamicinom CIPROFLOKSACIN 2x200-400mg IV, zatim p.o. / 7-10 dana

ječi se u osoba u kojih je najčešća, a to su: djevojke školske dobi, starije osobe, posebno žene u menopauzi, bolesnici sa šećernom bolesti, kod intermitentne i dugotrajne kateterizacije (Tablica 23) (20).

Rekurentne infekcije mokraćnog sustava

To su IMS dokazane i urinokulturom koje se javljaju 2 ili više puta u 6 mjeseci, odnosno 3 ili više puta u jednoj godini. Najčešće je to rekurentni cistitis žene, a u >95% žena radi se o reinfekciji.

Akutna epizoda liječi se kao sporadična infekcija (Tablice 16 i 17). Bolesnice koje imaju ≤ 2 epizode uroinfekcija u jednoj godini mogu kod pojave prvih simptoma samoinicijativno uzeti terapijsku dozu lijeka prema nalazu urinokulture i uspjeha liječenja prethodne uroinfekcije kroz tri dana. U bolesnica u kojih su isključene strukturalne i funkcionalne abnormalnosti urotakta i koje nemaju u času započinjanja profilakse simptome i znakove akutne infekcije, a koje imaju ≥ 3 epizode uroinfekcija u jednoj godini preporuča se profilaksa 6 mjeseci ili duže prema antibiogramu (Tablica 24) (20).

Antimikrobno liječenje IMS u većine se bolesnika započinje kao empirijsko, a zatim se usklađuje

Tablica 22. Antimikrobno liječenje bolničkih infekcija mokraćnog sustava i infekcija mokraćnog sustava sa stranim tijelom

Ambulantno liječenje
CIPROFLOKSACIN 2x500mg p.o. / 10-14 dana
Bolničko liječenje
NETILMICIN 4-6mg kg/ dan IV podijeljeni u 1-3 doze /10-14 dana + CEFTAZIDIM 3x1-2g IV ili CIPROFLOKSACIN 2x400mg IV, nastaviti p.o. / 10-14 dana

Tablica 23. Liječenje asimptomatske bakteriurije

Bolesnici	Duljina liječenja
trudnice	7 dana
novorođenčad predškolska djeca s V-U refluksom i abnormalnim urotaktom prije invazivnih uroloških, ginekoloških ili ortopedskih zahvata primaoci transplantiranog bubrega	3 – 7 dana prema antibiogramu

prema nalazu urinokulture. Jedino u bolesnica sa sporadičnom epizodom nekomplikiranog bakterijskog cistitisa ne mora se učiniti urinokultura pa empirijska terapija ostaje na razini empirijske.

Asimptomatska bakteriurija liječi se samo u odabranih osoba, a ne liječi se upravo tamo gdje je najčešća! Nalaz piurije u asimptomatskoj bakteriuriji ne opravdava antimikrobnu terapiju.

Empirijska antimikrobna terapija primjenjuje se prema rezultatima istraživanja najčešćih uzročnika kliničkih sindroma i njihove osjetljivosti na antimikrobna sredstva pa je upute za antimikrobno liječenje i profilaksu IMS potrebno revidirati barem svakih pet godina.

Ovim pregledom nastojali smo predložiti što više svakodnevnih problema koji postoje u terapiji spolnoprenosivih infekcija, infekcija mokraćnog sustava i sindroma prostatitisa, pa su dane osnovne smjernice kojima se većina situacija može obuhvatiti.

Tablica 24. Antimikrobna profilaksa rekurentnog cistitisa u žena

Broj uroinfekcija u godini dana	Antimikrobna profilaksa
≤ 2	Samoinicijativno uzimanje terapijske doze lijeka prema nalazu urinokulture i uspjeha liječenja prethodne uroinfekcije tijekom jednog ili 3 dana
≥ 3	Kontinuirano uzimanje profilaktičke doze lijeka svaku večer ili tri puta na tjedan Uzimanje profilaktičke doze lijeka nakon spolnog odnosa NITROFURANTOIN 50-100mg p.o. KOTRIMOKSAZOL 480mg p.o. CEFALEKSIN 250mg p.o. NORFLOKSACIN 200mg CIPROFLOKSACIN 125mg Intravaginalna primjena estrogena Intravaginalna primjena suspenzije laktobacila Brusnice

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes: ne postoji.

LITERATURA

1. Škerk V, ur. Spolno prenosive bolesti – izabrana poglavlja. Medicus 2003;12:155-256.
2. World Health Organization. Guidelines for the management of Sexually transmitted infections. Geneva: WHO; 2003.
3. Centers for Diseases Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR 2006; 55 (RR-11).
4. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. Am J Med 2002; 113 (Suppl 1A):5-13.
5. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infection. U: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases. New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005: 875-905.
6. Škerk V, Jakšić J, Begovac J. Pilot research on urinary tract infections in family medicine physician offices in the Republic of Croatia. J Chemother 2008; 20:397-8.
7. Škerk V, Škerk V, Jakšić J, Kolumbić-Lakoš A, Matrapazovski M, Maleković G, Tambić-Andrašević A, Radošević V, Markotić A, Begovac J. Research of urinary tract infections in family medicine physicians offices – empiric antimicrobial therapy of urinary tract infections – Croatian experience. Coll Antropol 2009; 33:625-31.
8. Tambić Andrašević A, Tambić T, ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008.g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009.
9. Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML, Riley DE. Epidemiology of prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(Suppl.1):S85-90.
10. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Clin Infect Dis 2007; 44/Suppl 3:73-129.
11. Škerk V. Liječenje spolno prenosivih infekcija. Pliva učilište. Glasnik 2008;26:1-4.
12. Škerk V, Francetić I. Novi pregled na primjenu azitromicina u liječenju spolno prenosivih infekcija. Pliva učilište. Glasnik 2005;14:1-4.
13. Lipozenčić J, ur. Spolno prenosive bolesti i infekcije. Zagreb: Medicinska naklada, 2003:3-118.
14. Referentni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH za dijagnostiku sifilisa i lajmske bolesti. Postupak za dijagnostiku i terapiju sifilisa. Zagreb: RF C MZSS RH, 2004.
15. Škerk V, Krhen I, Francetić I, Baršić B, Vrčić H. New View on Treatment of Sexually Transmitted Diseases with Azithromycin. Medicus 2004;13:247-53.
16. Škerk V, Markovinović, Zekan Š, Jakšić J, Židovec-Lepej S, Markotić A, Škerk V, Radošević V, Cvitković L, Begovac J. The significance of *Chlamydia trachomatis* in urethritis and prostatitis - differences in therapeutic approach - Croatian experience. J Chemother 2009; 21:63-7.
17. Rubin RH, Shapiro ED, Andriole VT, Davis RJ, Stamm WE. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. Clin Infect Dis 1992;15 (Suppl.1):216-27.
18. Rubin RH, Shapiro ED, Andriole VT, Davis RJ, Stamm WE with modifications by a European Working Party (Norrby SR). General guidelines for the evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. Taufkirchen, Germany: The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1993: 240-310.
19. Kučić Tepeš N, Bejuk D, ur. EU: Europske upute za analizu urina. Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2000.
20. Škerk V, Tambić-Andrašević A, Andrašević S, Sušić E, Mlinarić-Džepina A, Mađarić V, Milutinović S, Krhen I, Perić L, Bagatin J, Čorić M, Ferlin D, Cazin I, Tomac G. ISKRA smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava – hrvatske nacionalne smjernice. Liječ Vjesn 2009;131:105-18.
21. Škerk V, Krhen I, Kalenić S, Francetić I, Baršić B, Kuzmić AC, Derezić D, Jeren T, Kes P, Kraus O, Kuvačić I, Tambić-Andrašević A, Tešović G, Vrčić H. Guidelines for antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections. Liječ Vjesn 2004;126:169-81.
22. Škerk V, ur. Urogenitalne infekcije – izabrana poglavlja. Medicus 2006;15:207-344.
23. Naber KG, Bishop MC, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Cek M, Grabe M, Lobel B, Palou J, Tenke P. Guidelines of the management of urinary and male genital tract infections. Netherlands: European Association of Urology, 2006.
24. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Management of suspected bacterial urinary tract infections in adults: a national clinical guideline. Edinburgh: Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2006.
25. Geerlings SE, van den Broek PJ, van Haarst P, Vleming LJ, van Haaren KMA, Janknegt J, Platenkamp GJ, Prins JM. Optimization of the antibiotic policy in the Netherlands: SWAB guidelines for antimicrobial therapy for complicated urinary tract infections (UTIs). Netherlands: The Working Party on Antibiotic Policy (SWAB), 2006.
26. Weidner W, Anderson RU. Evaluation of acute and chronic bacterial prostatitis and diagnostic management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome with special reference to infection/inflammation. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(Suppl.1):S91-5.
27. Schaefer AJ, Anderson RU, Krieger JN, i sur. The assessment and management of male pelvic pain syndrome including prostatitis. U: McConnell J, Abrams P, Denis L, Khoury S, Roehrsom C, ur. Male lower urinary tract dysfunction. Evaluation and management. 6th International Consultation in prostate Cancer and prostate Diseases. Paris, France: Health Publications; 2006: 343-85.

Urogenital infections – antimicrobial treatment

Višnja Škerk, Alemka Markotić

University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“

Reference Centre for Urinary Tract Infections of the Croatian Ministry of Health and Social Welfare, Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Urogenital infections are among the most common infectious diseases of humans in the world. They are one of the leading causes of acute diseases, chronic health impairment and mortality. Sexually transmitted infections are important public health problem due to their epidemic spread, numerous complications leaving permanent consequences on the human health as well as large expenses that health care systems and individuals have to pay for their detection, prevention and treatment. Urinary tract infections are the most common bacterial infections in humans and the most common reason for justified antibiotic prescriptions. Prostatitis syndrome is the most common urological problem in males younger than 50 years of age and third most common urological problem in older men. This paper does not deal with all existing problems regarding antimicrobial treatment of sexually transmitted infections, urinary tract infections and prostatitis syndrome, however basic guidelines that cover the majority of conditions are presented.

Key words: urinary tract infections, sexually transmitted infections, prostatitis, antimicrobial treatment

Original submission: 08 September 2009.; **Accepted:** 09 December 2009.

Diagnostic methods and techniques in preventing cervical carcinoma Part I: Conventional cytology and new cytological methods

Ines Krivak Bolanča¹, Jasmina Vraneš²

¹Laboratory for Cytology and Clinical Genetics, Department of Gynecology and Obstetrics, Merkur University Hospital, ²Department of Microbiology, "Dr Andrija Stampar" Institute of Public Health; Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Cancer of the cervix is one of the most predictable and preventable types of cancer, however, it is still one of the most common malignancies. Due to a lack of information available to women about the causes of the disease, accessibility of screening programs, and limitations to the existing screening techniques, cervical cancer is the second most common type of cancer in women worldwide. Detection and follow-up of pre-cancer stages of the disease are based on the Pap test, which is now well established as a basic method of secondary prevention. Relative low sensitivity of the Pap test has initiated the development of additional technologies and methods towards enhanced screening quality and error elimination not only in the process of sample taking and analysis but also in screening and interpretation. Immunocytochemical methods and liquid based cytology are the new diagnostics possibilities in secondary prevention. In order to decrease morbidity, thus mortality too, it is necessary that the primary prevention (vaccination) be also implemented.

Key words: Pap test, immunocytology, liquid based cytology, HPV vaccines

INTRODUCTION

Even nowadays, cervical cancer still remains one of the leading causes of death in women and presents one of the most common malignancies affecting women worldwide (1,2). Since the introduction of the Pap test, incidence and mortality of cervical cancer have dramatically declined. Cervical cytology has become one of the most valuable cancer prevention interventions with significant diagnostic accuracy. In the countries where organized screening program is absent, the incidence of cervical cancer continues to rise, while in countries with adequate screening program prevention is shifted towards detection of precursor lesions of cancer (1). In countries of the developing world up to 80% of cases of cervical cancer and deaths occur because of the absence or poor screening programs. One of the most established and well known

Corresponding author:

Ines Krivak Bolanča
Laboratory for Cytology and Clinical
Genetics,
Department of Gynecology and Obstetrics,
Merkur University Hospital Zagreb,
Zajčeva 19, Zagreb, Croatia
Tel.: 00385 1 2431 390
Fax: 00385 1 2431 391
E-mail: ibolanca@inet.hr

Original submission:

30 October; 2009;

Revised submission:

19 December 2009;

Accepted:

22 December 2009.

Med Glas 2010; 7(1):12-17

screening methods is cervical smear popularly called Pap smear.

Conventional Pap test

Conventional Pap test includes three diagnoses: microbiological (detection of microorganism that can be identified either directly or indirectly by cytopathic effects on the cells), hormonal (quantitative analysis of estrogen effect on the cells depending on patient's age or/and history) and finally analysis of malignant changes of the cells.

In Croatia, a classification named "Zagreb 2002", which is a slightly modified classification of the „NCI Bethesda System 2001“, has been used in cytological analysis. By this classification squamous cell lesions are divided into three groups: 1) atypical squamous cells subdivided into ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance), ASC-H (atypical squamous cells where high grade lesion cannot be excluded); 2) low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) lesion and 3) squamous carcinoma. A parallel terminology and terms of cervical intraepithelial neoplasia – (CIN), and carcinoma in situ (CIS) has been retained to leave an opportunity for cytological and colposcopic follow-up. Glandular lesions are also classified into three groups as follows: atypical glandular cells with subdivisions as probably reactive changes, intraepithelial and invasive changes; adenocarcinoma in situ (AIS) and adenocarcinoma with noted origin of atypical cells. Conventional Pap test is also used as a differential diagnostic method predicting histological diagnosis and in that way generates diagnostic and therapeutic procedures (3).

Since 1953, when the first laboratory for cytology was established in Croatia, a network of laboratories has been developed. High number of cytological experts and their education, as well as education of cytotechnologists presents a force adequate to cover the female population if screened once in three years (3). As the result, 68% of the target population in Croatia was covered so incidence and mortality of cervical cancer has decreased (4).

Cytology as part of the screening program has some shortfalls, like an increasing number of taken Pap smears as a result of over-screening of

the population (usually well educated women with higher socio-economic status). On the other hand, women mainly from the rural parts make a part of population that is still un-screened. Besides, cytology results depend on quality of sampling and knowledge and experience of the observer. Being a subjective method, cytology and its potential interpretative mistakes resulted in a wide range of sensitivity and specificity rates. Sensitivity of cytology varies from only 30% - 90% and specificity is better and varies from 86 – 98.7 %. (3, 5)

Screening program is successful only if it covers as much female population as possible, and when the coverage is achieved, sensitivity of the screening test becomes very important (6).

Liquid-based cytology

Liquid based cytology (LBC) or thin layer cytology is a new technique for transferring exfoliated cells from cervix to the microscope slide. The sampling device, usually cervical broom, is immersed in a container with special transport medium. For conventional smears most of the sample is discarded with the sampling device while in LBC almost all collected cells are rinsed into the liquid and the entire sample is preserved. The liquid is aspirated through a membrane that detains the cells which are stamped onto a slide as a monolayer. There are several advantages of LBC: immediate liquid fixation prevents artifacts, smaller screening area makes screening easier, and clean background because of the reduced debris, blood or granulocytes which lead to significantly fewer unsatisfactory cases. Beside, various molecular tests (e.g. testing for human papilloma virus - HPV) and immunocytochemistry can be performed from the residual material without recalling the patients.

In studies comparing conventional Pap smears and LBC, cytology abnormalities such as LSIL or less were reported in larger number in LBC than in conventional smears while sensitivity and specificity for HSIL are similar in both techniques (7).

In spite the fact that liquid-based cytology is nowadays widely used in many European countries, evidence for confirming superiority and accuracy of liquid-based cytology to conventional cytology is yet insufficient (8).

HUMAN PAPILLOMA VIRUS AS ETIOLOGICAL FACTOR FOR CERVICAL CARCINOMA

Viral etiology of cervical cancer is firmly established. There are over 100 different types of human papilloma viruses but only dozen are highly carcinogenic for humans. The most frequent high risk types (hrHPV) are 16 and 18 associated with 70% of the cervical cancer, followed by 33, 31, 45, and 52 genotypes. These hrHPV types are responsible for precursor lesions as well as for cervical cancer. Types 16 and 18 were found in 50%-60% of high grade squamous lesions (HSIL) and in 25% of low grade lesions (L SIL) (9, 10).

HPV infection is extremely common and is transmitted between sexually active people. Almost 50% of sexually active young women are infected with HPV (9) but luckily, most high risk infections are subclinical and are spontaneously cleared by host immune response.

Cuzick (11) and coworkers compared sensitivity of cytology and a hrHPV testing showing hrHPV testing much more sensitive than cytology, with more variable specificity. Sensitivity range of hrHPV testing is from 68%-100% while cytology showed much more variations in sensibility depending on authors and country they come from and existence of uniform classification of cervical precancerous lesions in their country (12-16). The International Agency for Research on Cancer (IARC) recommended the following: "There is sufficient evidence, based on surrogate markers, that the efficacy of HPV testing, using a validated system, as the primary screening modality can be expected to be at least as good as that of conventional cytology".(9)

According to that a wide range of countries support the idea of using hrHPV testing as the primary screening test starting at age of 25 (17-19). HPV infections with high risk types are very common in women younger than 25 years of age, but the percentage of persistence of HPV infection is rather low, probably because of the adequate immune answer of young women for dealing with the HPV infection. Kjaer and coauthors (20) estimate the risk of atypia in general population of Danish women whose cervical cytology was negative and hrHPV DNA positive during more than 10 years of follow-up. Younger women

experienced 8% of moderate dysplasia or worse within five years of follow-up, and 13.4% within 10 years. Elderly women had risk of HSIL of 15.6% after five years, and 27.4% after 10 years. But patients with both negative tests had a much lower risk of cervical abnormalities (3.4%) after 10 years regardless of patient's age. These results indicate a high negative predictive value in patients with negative hrHPV DNA test as well as cytology on one hand, and on the other, single positive hrHPV DNA test can stratify patients at a different level of risk for developing cervical abnormalities.

There are lot of data suggesting usage of hrHPV testing in the 1) triage of borderline cytology and proving its better sensitivity than repeated cytology in women with equivocal cytology; 2) as a follow-up test for recurrence after cervical lesion treatment but no sooner than six months. That is the most sensitive way to detect persistent or recurrent lesions (5, 9). Hopefully, the clinicians will benefit from knowing about presence of specific HPV type, so infections with hrHPV with high oncogenic potential can be separated from those that can be less intensively managed (low risk HPV infections). That means that hrHPV positive test identifies those women who have risk of developing cervical lesions as long as the infection persist, but we cannot be sure if that is really going to happen.

TUMOR MARKERS IN PREDICTING OUTCOME OF CERVICAL LESION

To predict an outcome of HPV infection is a major challenge. A persistent high risk HPV type infection can lead towards malignant transformation by complex molecular pathways mediated by specific cellular proteins. These proteins – biomarkers can be categorized into different classes such as oncogenes, tumor suppressor gene, apoptotic markers, metabolic markers, imaging markers etc. (12), each of them is used in a specific way to understand the mechanism of cancer initiation and progression (21). The main event for carcinogenesis is integration of viral oncogenes E6 and E7 into host genom. If these genes are expressed at high levels, they interrupted normal cell cycle regulation and induce genomic instability (22).

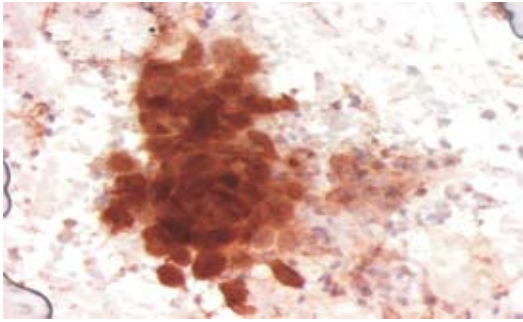


Figure 1. Positivity for p16 INK4a suggesting HSIL (x 450)

There are lots of regulating proteins involved in cell cycle control including p16^{INK4a}, minichromosome maintenance proteins 2, 4 and 5, Cyclin D1, prostaglandin E synthetase, TOP2A (topoisomerase 2 alpha). Telomerase overexpression has also been acknowledged as one of the markers of cervical carcinoma and high grade lesions on cervical biopsies (23). Expression of the E7 oncogene of hr HPV leads to functional inactivation of tumor suppressor retinoblastoma protein (pRB), because of hypermethylation or mutation which in turn, results in strong overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a}. This indicates that an active expression of the viral E7 oncogene is present in cancer and dysplastic cells which can be detected throughout the epithelium. Furthermore, p16^{INK4a} expression may help identify low grade lesions that are at an increased risk for progression to a high grade lesion (Figure 1) or cancer (Figure 2) and it has been found to reduce interobserver disagreement compared with the histological diagnosis (24-26).

In certain cervical lesions (mild to moderate) virus replication is evident in the upper part of epithelium, and the viral major capsid L1 antigen is expressed allowing immunochemical detection of an infected cell (Figure 3). This can be used as a tool for triaging early cervical abnormalities

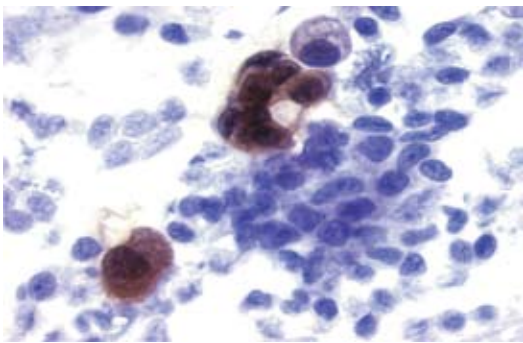


Figure 2. Positive p16 INK4a reaction in malignant cells (x 450)

with tendency to progress from those which are more likely regressible. Griesser et al. provided evidence that mild dysplasia without immunochemically detectable HPV L1 capsid protein can be expected to progress more likely (26). Reason for that is yet unknown, but probably the loss of L1 expression is due to the abnormalities in transcription pathways and to the process of integration into the genome.

Many molecular markers were evaluated for their role in cervical screening. Some of them like Ki-67, PCNA (proliferating cell nuclear marker) have shown limited potential, while others like CDC6 (DNA replication protein), mini-chromosome maintenance protein (MCM5) and p16^{INK4a} have shown high potential. (23)

A combination of tumor markers with other methods of secondary prevention will increase sensitivity and specificity of the assay (27).

VACCINATION

The development of prophylactic vaccine, based on the L1 capsid protein has started a new era in primary prevention of cervical carcinoma. Presently, there are two available vaccines: bivalent vaccine containing L1 of hrHPV types 16 and 18 (“Cervarix”, Glaxo Smith Kline, UK), and quadrivalent including two low risk types (HPV 6 and HPV 11, responsible for most condilomma cases), and two high risk types 16 and 18 (“Gardasil”, MSD, USA). Both vaccines have shown cross protection against infection with HPV 45 and 31 because of their genetic relatedness to HPV 18 and 16 respectively (28). HPV vaccination as a primary prevention together with secondary prevention (Pap test) will significantly reduce cervical cancer morbidity and mortality. However, integration of vaccination with scree-

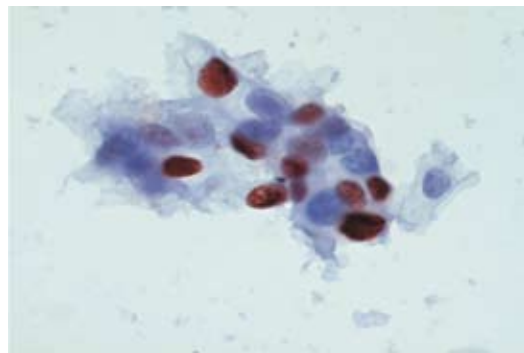


Figure 3. HPV L1 in LSIL lesion (x 450)

ning is a complex issue. Vaccination will likely prevent at least 70% of potential cancer. Protection is limited because of the multiplicity of HPV types, and vaccines contain only two most frequent types (1, 27-29). Other problems include yet uncertain need for booster doses, expensiveness of vaccines, undetermined population for vaccination (boys and girls or only girls), right age of first vaccination and etc. (30).

Besides vaccination, the cervical cancer primary prevention includes health education, and secondary prevention in addition to conventional

Pap test includes a large scale of different techniques, which can improve traditional screening programs. For example, liquid-based cytology and computer assisted cytology can speed up the screening process, and panel of biomarkers of the carcinogenic process and HPV testing can improve sensitivity and specificity of conventional methods.

ACKNOWLEDGEMENT/DISCLOSURE

Competing interests: none declared.

REFERENCES

1. Bosch Xavier, Harper D. Prevention of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynaecologic Oncology* 2006; 103:21-4.
2. Duić Ž, Kukura V, Zovko G, Ciglar S, Podobnik M, Krivak Bolanca I, Gašparov S.
3. Pajtler M, Audy-Jurković S, Kardum-Skelin I, Mahovlić V, Mozetić-Vrdoljak D, Ovanin Rakić A. Organisation of cervical cytology screening in Croatia: past, present, future. *Coll Antropol* 2007; 31(Suppl.2):47-54.
4. Znaor A, Strnad M. Cervical cancer in Croatia: State of art and possibilities for prevention. *Coll Antropol* 2007; 31(Suppl.2):37-40.
5. Pajtler M. Citodijagnostika u probiru. U: Audy-Jurkovic S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj 50 god poslije. Prvi međunarodni znanstveni simpozij kliničke citologije "Jasna Ivić", Zagreb, Hrvatska, svibanj 2003. Hrvatsko društvo za kliničku citologiju, Zagreb: 2003:113-20.
6. Cox T, Cuzick J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. *Gynaecologic Oncology* 2006; 103:8-11.
7. Davey E, d'Assuncao J, Irwing L, Macaskill P, Chan SF, Richards A, Farnsworth A. Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPrep Imager compared with conventional cytology: prospective study. *BMJ* 2007; 335-42.
8. Davey E, Barrat A, Irwing L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classification, and accuracy in liquid-based cytology versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet* 2006; 367:122-32.
9. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Handbook of Cancer prevention. Cervical Cancer screening. Lyon: IARC Press; 2005.
10. Marijan T, Vraneš J, Mlinarić-Džepina A, Leskovar V, Knežević J, Kvaternik M. Genital human papillomavirus infection in women from the Zagreb region. *Coll Antropol* 2007; 31(Suppl 2):83-7.
11. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer C, Hoyer H, Ratnam S. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical screening. *Int J Cancer* 2006; 119:1095-101.
12. Von Knebel, Doeberlitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38:22-9.
13. Schneider A. Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 2000; 89:529-34.
14. Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomez H, Holtz B, Schopp B, Garbrecht-Buettner S. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Brit J Cancer* 2003; 88:1570-77.
15. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, Zhang WH, Elson P, Pan QJ, Fisher C, Lorincz A, Zahniser D, Li L. Shanxi province cervical cancer screening study: a cross-sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001; 83:439-44.
16. Blumenthal PD, Gaffikin L, Chirenje ZM, McGrath J, Womack S, Shah K. Adjunctive testing for cervical cancer in low resource settings with visual inspection, HPV, and the Pap smear. *Int J Gynecol Obstet* 2001; 72:47-53.
17. Kotaniemi-Talonen I, Nieminen P, Anttila A, Hakama M. Routine cervical with primary HPV testing and cytology triage protocol in a randomised setting. *Br J Cancer* 2005; 93:862-7.
18. Znaor A, Babić D, Corusic A, Grce M, Mahovlic V, Pajtler M, Serman A. Proposal of cervical cancer early detection programme in Croatia. *Lijec Vjes* 2007; 129:158-63.
19. Nygård JF, Skare GB, Thorensen SØ. The cervical cancer screening programme in Norway 1992-2000: changes in Pap smear coverage and incidence of cervical cancer. *J Med Screen* 2002; 9:86-91.
20. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, Meijer C, Lorincz A, Iftner T. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Research* 2006; 66:1630-6.

21. Von Knebel Doeberlitz, Syrjänen KJ. Molecular markers: How to apply in practice. *Gynecol Oncol* 2006; 103:18-20.
22. Zur Hausen H: The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 2009 Sep 15; 392(1):1-10.
23. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR: Human papilloma testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111:1-4.
24. Krivak Bolanca I, Šentija K, Katalenić Simon S, Kukura V, Vraneš J. Estimating clinical outcome of HPV induced cervical lesion by viral protein L1 and p16INK4a protein combination. *Coll Antropol* 2010; (in press).
25. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a- stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer* 2005; 105:461-7.
26. Griesser H, Sandre H, Hilfrich R, Moser B, Schenck U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in Pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Analyt Quant Cytol Histol* 2004; 26:241-245.
27. Krivak Bolanca I, Ciglar S. Evaluation of p16INK4a in cervical lesion of premenopausal and postmenopausal women. *Coll Antropol* 2007; 31(Suppl.2):107-11.
28. Franco EL, Ferency A. Cervical cancer screening following in implementation of prophylactic human papillomavirus vaccination. *Future Oncol* 2007; 3:319-27.
29. Adams M, Jasani B, Fiander A Human papillomavirus (HPV) prophylactic vaccination: Challenges for public health and implications for screening. *Vaccine* 2007; 16:3007-13.
30. Sussman A, Helitzer D, Sanders M, Urquieta B, Salvador M, Ndiaye K. HPV and cervical cancer prevention counseling with younger adolescents implications for primary care. *Annals of Family Medicine* 2007; 5:298-304.

Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection

Adriana Vince, Snježana Židovec Lepej

University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Clinical diagnostics of HPV infection is based on analytically and clinically validated assays for qualitative detection of HPV DNA from high risk genotypes. New generation of HPV DNA assays combines qualitative detection of 12 high-risk HPV genotypes with HPV-16 and HPV-18 genotyping. New generation of HPV molecular assays designed to increase clinical specificity of molecular testing is based on detection of mRNA for E6 and E7.

Key words: HPV DNA, molecular diagnostics, PCR, hybridisation

Corresponding author:

Snježana Židovec Lepej,
University Hospital for Infectious Diseases
"Dr. Fran Mihaljević"
Tel.: 00385 1 4603 294
Fax: 00385 1 4603 131
Mirogojska 8, 10 000 Zagreb, Croatia
E-mail: Snjezana.Zidovec.Lepej@bfm.hr

Original submission:

31 October 2009;

Accepted:

08 December 2009.

Med Glas 2010; 7(1):18-25

INTRODUCTION

Establishment of an unequivocal association between persistent genital infection with high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes and development of cervical cancer encouraged a development of molecular assays for clinical diagnostics of HPV infection (1-3). In addition to well-established standard-of-care clinical HPV DNA assays, new generations of molecular assays incorporating partial HPV genotyping (HPV-16/HPV-18) or mRNA E6/E7 detection have been developed and are extensively evaluated (4). Emerging new technologies for cervical cancer screening in both developed countries as well as in resources-limited settings are currently being developed in order to increase positive predictive value of testing (5).

The purpose of this review is to summarize current data on existing diagnostic methods aimed at cervical cancer prevention and to present emerging technologies for the future.

CLINICAL UTILITY OF HPV DNA ASSAYS

Human papillomaviruses (HPV) are a genetically heterogeneous group of DNA viruses that can induce benign proliferation and malignant transformation of its target epithelial cells (skin, ano-

genital and oropharyngeal mucosa) (1-3). To this date, more than 200 genotypes of HPV have been described and a little more than a 100 of them have been officially designated and classified (6). Forty HPV genotypes from the alpha genus infect anogenital area and are transmitted mainly through sexual intercourse.

HPV infection is common in adolescents and young women upon the onset of sexual activity. However, the majority of the newly-acquired HPV infections will resolve spontaneously.

Persistent infection with at least 14 alpha HPV genotypes (designated high-risk) can, over the period of several years and in association with other co-factors, lead to progressive cervical disease and subsequently invasive cervical cancer (3). The ability of high-risk HPV genotypes to induce malignant transformation of target cells is related to E6 and E7 viral oncoproteins that interact with key cell cycle proteins (p53 and pRB) and override physiological G1/s and G2/M cell cycle check-points (2). These molecular events result in chromosomal instability, accumulation of other oncogenic mutations, increased loss of growth control and subsequently result in malignant transformation of cells that can be morphologically recognised and classified as various stages of cervical intraepithelial neoplasia by cytology.

Epidemiological classification of HPV genotypes with respect to the risk for cervical cancer is based on the study by Munoz et al (2003) that analyzed the data from 11 case-control studies conducted in 9 countries on 1918 patients with histologically confirmed squamous-cell cervical cancer and 1928 controls (7). The study showed that HPV-16 and HPV-18 are associated with 70.7% of cervical cancers worldwide. In addition to HPV types 16 and 18, HPV genotypes -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, and -82 should be classified as high-risk genotypes whereas HPV genotypes 26, 53, and 66 should be considered probably carcinogenic (7). Noteworthy, HPV-66 is included in the high-risk HPV genotype group targeted by the new generation of HPV molecular assays.

Exceptional oncogenic potential of HPV-16 and HPV-18 *in vivo* has been confirmed by Khan et al (2005) (8). Over the period of the 10-year fo-

llow-up, Khan et al (2005) showed an increased risk of cervical cancer development in women with persistent infection with HPV-16 and HPV-18 compared with other high-risk genotypes (8). Noteworthy, distribution of HPV genotypes in cervical samples of women with normal cytology and low grade cervical lesions is quite heterogeneous.

Recognition of an association between persistent HPV infection and cervical cancer encouraged a development of various molecular assays for clinical diagnostics of HPV infection (4).

Food and Drug Administration (FDA) approved combined HPV DNA testing and Pap smear for primary cervical cancer screening of women aged 30 years or older (9). A number of studies from Europe and the USA evaluated cervical cancer screening programs based on a combination of cytology and HPV DNA testing. A pooled analysis of these studies by Cuzick et al (2006) showed superior sensitivity and specificity of HPV DNA testing for detection of CIN2 or more in women aged 30 or older (95% and 93%, respectively) (10). In women with ASC-US, pooled sensitivity of cytology was only 60% with very high specificity (97%) (10).

In addition to primary screening, HPV DNA testing is recommended for triage of women with ASC-US to help determine if women should be referred to colposcopy (9). HPV DNA assays are also clinically useful as a part of the recommended postcolposcopy management to detect possible residual disease (9).

In a recent meta-analysis and systematic review, Cuzick et al (2008) identified four main clinical applications of HPV molecular assays: 1. triage of women with equivocal or low-grade cytological abnormalities; 2. follow-up of women with abnormal screening result who are negative at colposcopy/biopsy; 3. prediction of the therapeutic outcome after treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN); 4. primary screening HPV DNA test, solely or in combination with Pap smear to detect cervical cancer precursors (5).

Additionally, Cuzick et al (2008) argued that in countries with good quality of cytology, primary screening should be based on HPV DNA testing only and that cytology should be used for triage of HPV-positive women only (5).

STANDARDIZED ASSAYS FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS OF HPV INFECTION

Standardized molecular assays for HPV diagnostics are quite heterogeneous and can be classified as signal amplification assays (hybridization assays), target amplifications assays (PCR, real-time PCR) as well as other types of technologies (microarrays etc.).

Based on assay design and target molecules, HPV assays can be classified into four main groups: clinical HPV DNA assays that are based on qualitative detection of HPV DNA from high risk genotypes, new generation of clinical HPV DNA assays that, in addition to qualitative detection of high risk genotypes, provides individual genotyping of HPV-16 and HPV-18, assays for individual HPV genotyping mainly used for epidemiological purposes and assays for detection of HPV mRNA.

Clinical HPV DNA assays

American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) 2006 guidelines emphasize that clinical diagnostics of HPV infection should be based on assay that „have been analytically and clinically validated with proven acceptable reproducibility, clinical sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for cervical cancer and verified precancer (CIN 2,3), as documented by FDA (Food and Drug Administration) approval and/or publication in peer-reviewed scientific literature“ (9).

Meier et al (2009) published guidelines on the requirements for clinical HPV DNA assays that can be used in primary cervical cancer screening in women 30 years and older (11). The authors emphasize that clinical HPV DNA tests should achieve „an optimal balance between clinical sensitivity and specificity for detection of high-grade CIN and cervical cancer to minimize redundant or excessive follow-up procedures for high-risk HPV positive women without cervical lesions“ (11). Assays with very high sensitivity but low clinical specificity can yield a large number of clinically insignificant positive findings that will result in unnecessary follow-up and diagnostics procedures that will fail to contribute to women's health.

Clinical diagnostics of HPV infection today is based on qualitative molecular assays designed to detect 13 or 14 high risk HPV genotypes (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 and HPV-68) in cervical samples.

Currently two FDA-approved assays are available: *digene* Hybrid Capture 2 HPV DNA assay (Qiagen, Inc., Gaithersburg, MD) and Cervista HPV HR test (Third Wave Technologies Inc./Hologic Inc.; Madison, WI, USA). Additionally, a large number of clinical and public health laboratories use a CE-certified Roche Amplicor HPV test (Roche Diagnostics, USA) that has not been FDA-approved but has consistently confirmed its clinical usefulness in peer-reviewed scientific literature.

Hybrid capture 2 is a signal amplification assay that uses full-length complementary RNA probes that hybridize to DNA from high-risk HPV genotypes, either as episomal targets or after integration to a provirus (12). The assay is technically simple, accessible to non-PCR laboratories and is available in semi-automated (Rapid Capture System) format that is currently being modified into high throughput system (QIAensemble) (12).

Hybrid capture 2 is FDA-approved for: (1) reflex testing from an ASC-US Pap smear and liquid-based cytology and (2) for adjunctive screening with cytology in women aged 30 or older (12). Clinical sensitivity of hybrid capture 2 for detection of CIN2 or more and cervical cancer ranges between 85-100% (5,9,13-15). Negative predictive value (NPV) of 99-100% was obtained when results of hybrid capture 2 and cytology were considered together (5,13,16). A high NPV indicates that women with normal cytology and negative hybrid capture 2 results have exceptionally low risk of developing cervical cancer. However, several studies raised a concern over analytical inaccuracy of this assay due to the cross-reactivity of its probes with a number of low-risk HPV types not included in the assay (17,18).

Several studies compared the analytical specificity and clinical sensitivity of Amplicor HPV assay and hybrid capture 2 assay for the detection of high risk HPV genotypes as well as for detection of high-grade cervical lesions and cervical cancer (15,19-21). Mo et al (2008) analyzed the perfor-

mance of the two assays on 470 cervical samples and found 96.2% agreement (19). The main conclusion of the study was that both assays have comparable sensitivity and specificity and are appropriate for use in routine diagnostic setting.

Wentzensen et al. (2009) published the most extensive comparison between Amplicor HPV test and hybrid capture 2 test in ASC-US and LSIL triage study that enrolled a total of 3277 women (22). The study compared the ability to detect 2-year cumulative incidence of CIN3 and ability to detect 13 high-risk HPV genotypes. At the cutoff value 0.2, Amplicor HPV test had significantly higher sensitivity for CIN3 detection compared with hybrid capture 2 (95.8% vs. 92.6%) but lower specificity (38.9% vs. 50.6%) (22). Wentzensen et al (2009) showed that analytical specificity of Amplicor HPV test was superior to that of hybrid capture 2, confirming the results of Poljak et al (2002) on cross-reactivity of hybrid capture probes with HPV genotypes not declared by the assay (22,17).

Recently, Day et al (2009) described the analytical performance of Cervista HPV HR test that has been approved by the FDA in March 2009 (23). Analytical sensitivity of the assay ranged between 1250 and 7500 copies per reaction, depending on the high risk HPV genotype and no cross-reactivity with seven non-oncogenic HPV types was observed. Further studies on clinical performance of this assay are expected (23).

In Croatia, HPV DNA testing by clinical assays (hybrid capture II and Amplicor HPV test) is available in Zagreb, Rijeka, Split and Osijek and is reimbursed by health insurance. Several studies conducted in Croatian patients by hybrid capture 2 (Vince et al, 2002; Židovec Lepej et al, 2007) and Amplicor HPV assay (Marjan et al, 2008) provide an insight into the burden of HPV infection in Croatia (16, 24, 25).

New generation of clinical HPV DNA assays

New generation of HPV DNA assays combines individual HPV-16 and HPV-18 genotyping with qualitative detection of other 12 high risk genotypes (HPV-31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 and -68). In contrast to hybrid capture 2 and Amplicor HPV test, new generation HPV DNA assays also detect high risk HPV-66 genotype.

Introduction of HPV-16/HPV-18 individual genotyping in assays designed for routine diagnostic purposes was based on the results of two well-established clinical studies conducted in the USA and Brasil (8,9,26). In the first study, Khan et al (2005) analyzed the incidence of CIN3 in a cohort of women with normal cytology from Portland aged 30 or older during a 10-year follow-up (8). At the end of the follow-up period, CIN3 was detected in 21% of women infected with HPV-16 and 18% of women infected with HPV-18 whereas only 1.5% of women infected with other high-risk genotypes developed CIN3. In a study conducted in Brazil, Schlecht et al. also demonstrated increased incidence of HSIL in women infected with HPV-16 and HPV-18 versus other high-risk HPV genotypes (26). The results of these studies clearly demonstrated an exceptionally high oncogenic potential of HPV-16 and HPV-18 compared to other high-risk HPV genotypes *in vivo*.

These observations were a basis for the statement on individual HPV genotyping in the recent 2006 ASCCP guidelines that „specific type of high-risk or oncogenic HPV that a woman has may be an important indication of her risk for CIN2 or greater (9). At the time of ASCCP 2006 guidelines publication, no FDA-approved assays for individual HPV-16 and HPV-18 genotyping were available. Nevertheless, ASCCP presented a concept of clinical usefulness of individual genotyping in women aged 30 years or older with normal cytology and positive result of qualitative HPV DNA assay stating that this group of women could benefit from individual HPV-16/HPV-18 genotyping. ASCCP recommends that women infected with HPV-16 and HPV-18 would be referred for colposcopy whereas women infected with other high-risk genotypes could be tested again after one year (both cytology and HPV DNA test) (9). Wright et al (2007) emphasized that this concept could ensure that women at increased risk of having false-negative cytology still get referred for colposcopy (9).

Since the publication of ASCCP 2006 publication, Cervista HPV 16/18 test was approved by the FDA for two clinical indications: (1) in women 30 years or older the test may be used adjunctively with the Cervista HPV HR test in combination with cervical cytology to assess the presence

or absence of specific high-risk HPV types and (2) used adjunctively with the Cervista HPV HR test in patients with ASC-US cervical cytology results, to assess the presence or absence of specific high-risk HPV types (23).

In 2009, the first new generation real-time PCR assay based on individual HPV-16 and HPV-18 genotyping and simultaneous detection of 12 other high-risk genotypes (including HPV-66) Abbott *RealTime* High Risk HPV test (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) was introduced to the European market. Abbott HPV test is a fully-automated high-throughput assay that uses a mixture of modified GP5+/6+ primers and is validated for PreservCyt samples (Hologic, Marlborough, USA).

Literature data on analytical and clinical validation of this assay are scarce. To the best of our knowledge, to this date only five studies on this assay have been published; three manufacturer-based validation studies and two independent studies (27-31). Poljak et al (2009) analyzed the analytical specificity and clinical sensitivity of the new Abbott HPV assay for detection of high-risk HPV genotypes in samples from women with cervical cancer and CIN3 in comparison with the standard hybrid capture 2 assay (30). The results of this study showed comparable clinical sensitivity of Abbott HPV assay and hybrid capture 2 assay for detection of high-risk HPV genotypes in samples from women with CIN3 (91.8% vs. 89.1%) and cervical cancer (88.4% and 87.3%) (30). This study showed that the new Abbott HPV assay has comparable clinical sensitivity for CIN3 and cervical cancer with the standard hybrid capture 2 assay.

Diagnostic value of this assay in primary screening setting was analyzed by Kaliterna et al (2009) (31). The performance of the Abbott HPV assay was compared with the standard method (hybrid capture 2) in by testing samples (n=108) collected from Croatian women as a part of routine screening in public health setting and discordant samples were further analyzed by using INNO-LiPA assay (Innogenetics, Belgium) mainly used for epidemiological purposes. The results of this study showed that both assays produced comparable results but some analytical and clinical discrepancies were noted. Hybrid capture 2

failed to detect two samples with CIN2 whereas Abbott HPV test failed to detect HPV-18 in two samples (detected by INNO-LiPA) (31).

Roche Diagnostics (USA) announced a new generation HPV assay to be launched in Europe at the end of 2009. The assay is also based on a combined individual HPV-16 and HPV-18 genotyping as well as detection of 12 other high-risk genotypes in cervical samples. The assay is based on real-time PCR technology and will be performed on a newly-developed fully automated molecular platform. Castle et al (2009) published the first available validation of the prototype real-time PCR assay for detection of 12 high-risk HPV genotypes and simultaneous individual HPV-16/HPV-18 genotyping designated cobas 4800 HPV test (32). The assay was analytically validated by comparing results with Linear Array assay for individual HPV genotyping. Overall agreement between the two assays was 94.7% (32).

In conclusion, a new generation of molecular assays for clinical diagnostics of HPV infection that, in addition to detection of high-risk HPV genotypes, allows individual HPV-16/HPV-18 genotyping could represent a standard of HPV molecular diagnostics in the future. However, introduction of these assays in routine diagnostics should be based on results of future studies designed to demonstrate clinical value of these assays, particularly in screening.

Assays for individual HPV genotyping

Monitoring of HPV genotype distribution in women with normal cytology, low and high grade cervical lesions and cervical carcinoma provides important data on the molecular epidemiology of HPV infection, natural history of disease and vaccine coverage (32,33). Distribution of HPV genotypes in cervical samples was extensively investigated in 1990-s by a variety of in house molecular assays mostly in research setting. The advent of standardized molecular assays for individual HPV genotyping enabled routine molecular laboratories to perform individual HPV genotyping in various patient groups.

Standardized molecular assays for HPV genotyping are based on amplification of common HPV sequences by consensus primers and line-probe hybridization step with type-specific oligonucle-

otide probes that allow precise identification of HPV genotypes. The most frequently used assays for individual HPV genotyping are Linear Array (Roche Diagnostics, USA) that identifies 37 HPV genotypes and INNO-LiPA Extra (Innogenetics, Belgium) that identifies 27 HPV genotypes (5). Both assays are able to identify coinfections with multiple HPV genotypes that are present in approximately 30% of infected women.

Recently, a new Digene HPV genotyping assay has been introduced and validated (34). This assay identifies 18 high-risk HPV genotypes and has been developed primarily for possible clinical use. Recently, Seme et al (2009) published the first evaluation of Digene HPV Genotyping RH Test RUO (Qiagen, Hilden, Germany) in comparison with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Test (Innogenetics, Gent, Belgium) (34). The results of this study showed that the novel Digene test is suitable for detection of high-risk HPV genotypes from clinical samples. Due to increased sensitivity, INNO-LiPA identified more samples with multiple HPV genotypes compared with Digene assay. However, clinical implications of this finding need to be fully evaluated in the future.

Assays for detection of HPV mRNA

One of the biggest challenges in the clinical HPV diagnostics is how to discriminate between clinically insignificant transient infections and persistent infections with high risk genotypes that can lead to the subsequent development of cervical carcinoma. One of the new concepts in efforts to increase the specificity of HPV testing is the development of nucleic acid amplification tests based on detection of E6/E7 mRNA (4,5). It has been unequivocally established that expression of mRNA for oncoproteins E6 and E7 is an essential step leading to the malignant transformation of cells and development of cervical cancer (3). Detection of mRNA for E6/E7 could predict more accurately the likelihood of progression to high-grade cervical lesions and cancer compared with DNA detection (4).

Currently, two mRNA assays for E6/E7 are available: Norchip Proffer Assay that detects five high risk HPV genotypes and Gen-Probe APTIMA HPV Assay that detects E6/E7 mRNA from 14 high risk HPV genotypes (4). Dockter et al (2009)

analyzed the clinical performance of the APTIMA HPV Assay for detection of infection with high risk HPV genotypes and high grade cervical lesions, in comparison with hybrid capture 2 (15). The most important finding of this study was an increased clinical specificity of APTIMA HPV Assay for detection of CIN2+ and CIN 3+ compared with hybrid capture 2 test. Clinical specificities of APTIMA HPV Assay and hybrid capture 2 for detection of CIN2+ were 55% and 47%, respectively. Clinical specificities of APTIMA HPV Assay for detection of CIN3+ (53%) was higher compared with hybrid capture 2 (44%) (15).

EMERGING TECHNOLOGIES IN HPV DIAGNOSTICS

In an attempt to increase the positive predictive value of diagnostic techniques for cervical cancer screening, a number of novel molecular technologies are currently being developed and validated: determination of HPV viral load, HPV integration assay, methylation profile and TERC-gain assays (4). Gravitt et al (208) recently published an extensive review on new technologies in cervical cancer screening including both molecular methods as well as a variety of other approaches.

Possible clinical importance of HPV viral load was documented in two studies showing an association between HPV-16 viral load and progression to CIN2/3 as well as cervical carcinoma in situ (35,36). Diagnostic concept of HPV viral load determination is limited by the need for type-specific quantitation, presence of coinfection with high-risk HPV genotypes in some women and the lack of an association between viral load and clinical progression for HPV genotypes other than 16 (4).

The role of integration of HPV-16 and other high-risk genotypes and malignant transformation of cells has been very well established (4). However, it should be emphasized that detection of integrated transcripts does not presume their transcriptional activity. Therefore, future strategies should focus on development of molecular assays capable of detecting transcriptionally active integrants that are of moderate complexity and could be implemented in routine diagnostic setting.

In vitro data from tumor-derived cell lines and analysis of cervical samples from HPV-infected women with both normal and abnormal cytolo-

gy suggest that CpG hypomethylation correlated with carcinogenic progression (37). This finding was the basis of the concept that methylation may represent a cervical cancer screening marker that would have superior specificity compared with cytology or HPV DNA testing. By using a panel of 3 methylated genes (DAPK1, RARB and TWIST1, Feng et al (2005) enabled detection of CIN3 or cervical cancer with a sensitivity of only 60% (lower than HPV DNA testing) but high specificity (95%) (38). Another emerging concept is the combination of detection of integrated HPV DNA and promoter methylation analysis to increase sensitivity (4).

Gain in the human telomerase gene RNA component (TERC) (> 2 copies of the q-arm of chromosome 3) occurs in around 80% of invasive cervical cancers and is one of the most pronounced

chromosomal abnormalities in squamous cells and cervical adenocarcinomas (4,39). Genomic amplification of TERC gene in Pap smears predicted progression of CIN1/2 to CIN3 with very high sensitivity (100%) and 70% sensitivity (39). Further studies are needed to evaluate the possible clinical value of this method.

In conclusion, clinical utility of standardized HPV DNA assays in cervical cancer prevention and treatment-follow-up of patients has been very well established. Introduction of individual HPV-16 and HPV-18 genotyping as well as other emerging molecular technologies are likely to increase the clinical specificity of molecular testing for HPV infection.

ACKNOWLEDGEMENT/DISCLOSURE

Transparency declaration: None to declare

REFERENCES

- zur Hausen, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* 1981; 12:S124-8.
- Bosch X, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shak KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244-65.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:1-17.
- Gravitt PE, Coutlee F, Iftner T, Sellors JW, Quint WGV, Wheeler CM. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine* 2008; 26S:K42-K52.
- Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand M-H, Dillner J, Meijer CJLM. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008; 26S:K29-K41.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2008; 97:1072-9.
- Wright Jr TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening test. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:346-55.
- Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Shalini K, Sasieni P, Thomas I. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119:1095-101.
- Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DAM, Snijders PJF. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009; 124:516-20.
- Elder PS, Lou J, Huff J, Macioszek J. The next-generation Hybrid Capture High-Risk HPV DNA assay on a fully automated platform. *J Clin Virol* 2009; 51:585-592.
- Wright JrTC, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103:304-9.
- Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* 2003; 88:1570-7.
- Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonogo J, Giachetti C. Clinical performance of the AP-TIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol* 2009; 45:555-561.
- Vince A, Kutela N, Isic-Bes J, Harni V, Ivanisevic M, Sonicki Z, Culig Z, Poljak M. Clinical utility of molecular detection of human papillomavirus in cervical samples by hybrid capture technology. *J Clin Virol* 2002; 25:S109-12.

17. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol* 2002; 25:S89-97.
18. Castle PE, Solomon D; Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M. Human papillomavirus genotype specificity of Hybrid Capture 2. *J Clin Microbiol* 2008; 48:2595-604.
19. Mo LZ, Monnier-Benoit S, Kantelip B, Petitjean A, Riethmuller D, Pretet JL, Mouglin C. Comparison of AMPLICOR and Hybrid Capture II assays for high-risk HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology: use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results. *J Clin Virol* 2008; 41:104-10.
20. Carozzi F, Bisanzi S, Sani C, Zappa M, Cecchini S, Ciatto S, Confortini M. Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 assay in detection of high-risk human papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45:364-9.
21. Halfon P, Trepo E, Antoniotti G, Bernot C, Cart-Lamy P, Khiri H, Thibaud D, Marron J, Martineau A; Penaranda G, Benmoura D, Blanc B, RBML (Reseau de Biologie Moleculaire Liberale). Prospective evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR human papillomavirus (HPV) tests for detection of 13 high risk HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. *J Clin Microbiol* 2007; 45:364-9.
22. Wentzensen N, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. A study of Amplicor human papillomavirus DNA detection in the atypical squamous cells of undetermined significance-low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:1341-9.
23. Day SP, Hudson A; Mast A, Sander T, Curtis M, Olson S, Chehak L, Ledford J, Yen-Lieberman B, Kohn D, Quigley DI, Olson M. Analytical performance of the Investigational Use Only Cervista HPV HR test as determined by a multi-center study. *J Clin Virol* 2009; 45:S63-S72.
24. Židovec Lepej S, Grgić I, Poljak M, Iščić-Beš J, Škerk V, Vince DB, Dušek D, Vince A. Detection of human papillomavirus genotypes 16/18/45 by hybrid capture hybridisation genotyping probe in clinical specimens. The first report. *J Clin Virol* 2007; 40:171-2.
25. Marjan T, Vraneš J, Mlinarić-Dzepina A, Leskovar V, Knezevic J, Kvaternik M. Genital human papillomavirus infection in women from the Zagreb region. *Coll Antropol* 2007; 31:83-7.
26. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286:3106-14.
27. Huang S, Tang N, Mak W-B, Erickson B, Salituro J, Li Y, Krumpel E, Schneider G, Yu H, Robinson J, Abravaya K. Principles and analytical performance of Abbott RealTime HR HPV test. *J Clin Virol* 2009; 45:S13-7.
28. Tang N, Huang S, Erickson B, Mak W-B, Salituro J, Robinson J, Abravaya K. High-risk HPV detection and concurrent HPV 16 and 18 typing with Abbott RealTime High Risk HPV test. *J Clin Virol* 2009; 45:S25-9.
29. Huang S, Erickson B, Tang N, Mak W-B, Salituro J, Robinson J, Abravaya K. Clinical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal cytology. *J Clin Virol* 2009; 45:S19-23.
30. Poljak M, Kovanda A, Kocjan BJ, Seme K, Jančar N, Vrtačnik-Bokal N. The Abbott RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytical specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatoven APA* 2009; 18:94-103.
31. Kaliterna V, Židovec Lepej S, Vince A. Comparison between Abbott RealTime High Risk HPV assay and Hybrid Capture II assay for detecting high risk HPV DNA in cervical specimens. *J Med Microbiol* 2009 (in press).
32. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:475-87.
33. Milutin Gasperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi S, Grece M. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008; 14:355-63.
34. Seme K, Lepej SZ, Lunar MM, Iscic-Bes J, Planinic A, Kocjan BJ, Vince A, Poljak M. Digene HPV genotyping RH test RUO: comparative evaluation with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detection of 18 high-risk and probable high-risk human papillomavirus genotypes. *J Clin Virol* 2009; 46:176-9.
35. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 2004; 112:854-9.
36. Fontaine J, Hankins C, Mayrand MH, Lefevre J, Monney D, Gagnon S, Rachlis A, Pourreaux K, Fereznzy A, the Canadian Women's HIV Study Group, Coutlee F. High levels of HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS* 2005; 19:785-94.
37. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003; 77:6227-34.
38. Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Dem A, Sow PS, Dembele B, Toure P, Sova P, Laird PW, Kiviat NB. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from patients with cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:1178-84.
39. Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Wang ZY, Auer G, Steinberg W, Ried T. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol* 2005; 166:1229-38.

Određivanje antimikrobne rezistencije *Chlamydia trachomatis* i primjena dosadašnjih spoznaja u svakodnevnoj praksi

Sunčanica Ljubin Sternak¹, Višnja Škerk²

¹Odsjek za klamidije, Služba za mikrobiologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, ²Referentni centar za infekcije mokraćnog sustava Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"; Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) danas je najčešći bakterijski uzročnik spolno prenosivih bolesti. Uspjeh liječenja ovisi o izboru antimikrobnog lijeka, te je veoma važno poznavati antimikrobnu osjetljivost ovog patogena. Kultivacija u staničnoj kulturi metoda je izbora dijagnostike *C. trachomatis*, kada se radi o sudsko medicinskim vještačenjima, kontroli nakon provedene terapije, a služi i u svrhu određivanja antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis*. Tetraciklini, makrolidi i kinoloni uobičajeno se primjenjuju za liječenje infekcije *C. trachomatis*. Na ove antibiotike opisana je rezistencija kod sojeva izoliranih u neuspješno liječenih bolesnika. Svi do sada opisani izolirani rezistentni klinički sojevi pokazuju tzv. „heterotipnu rezistenciju“. Do danas nije opisana „homotipna rezistencija“ u izolata izoliranih u ljudi. Procjena antimikrobne rezistencije i ishoda liječenja infekcije *C. trachomatis* otežana je nedostatkom standardizacije testova kao i činjenicom da *in vitro* rezistencija ne korelira s kliničkim ishodom. S ciljem stjecanja što više podataka o rezistenciji *C. trachomatis* preporuča se svaku sumnju u neuspješno liječenje infekcije spolnomokraćnog sustava uzrokovane *C. trachomatis* potvrditi ili isključiti dijagnostičkom metodom izolacije na staničnoj kulturi te izolirane sojeve prosljediti u specijalizirani laboratorij.

Ključne riječi: *C. trachomatis*, kultivacija, heterotipna rezistencija

Corresponding author:

Sunčanica Ljubin Sternak,
Odjel za virologiju, Hrvatski zavod za
javno zdravstvo
Rockefellerova 12, 10 000 Zagreb,
Hrvatska
Phone: +385 1 4863295;
Fax: +385 1 4683017;
E-mail: sljsternak@hzjz.hr

Originalna prijava:

09 Septembar 2009.;

Korigirana verzija:

08 Decembar 2009.;

Prihvaćeno:

09 Decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):26-31

UVOD

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) danas je najčešći bakterijski uzročnik spolno prenosivih bolesti (1). Simptomatske infekcije spolnomokraćnog sustava u muškaraca se očituju kao uretritis, epididimitis i prostatitis, a u žena kao cervicitis, uretritis i zdjelična upalna bolest. U Hrvatskoj, u muškaraca uretritis uzrokuje u 18,5% slučajeva, s najvećom prevalencijom (35,3%) u dobi od 18 do 25 godina (2), dok kronični prostatitis uzrokuje u 10% slučajeva (3). U žena s kliničkom prezentacijom mukopurulentnog cervicitisa dokazana je u 9,4% slučajeva (4). Prevalencija u žena, jednako kao i kod muškaraca najviša je u adolescentskoj dobi (15-19 godina) i iznosi od 3,6-16,4% (5,6). Nažalost, velik je broj asimptomatskih infekcija i procjenjuje se da 50-80% žena i muškaraca nema nikakvih ili pokazuje blage i teško prepoznatljive simptome unatoč infekciji (2,7,8). Ovakve „tihe“ infekcije teško se otkrivaju i kasno liječe što ima za posljedicu ozbiljne komplikacije kao što su izvanmaternična trudnoća i/ili sterilitet (1). Stoga se u novije vrijeme puno pažnje polaže na programe probira i aktivno traženje inficiranih osoba kako bi liječenje bilo što uspješnije (9). Osim aktivnog traženja, sve veća detekcija inficiranih osoba rezultat je i razvoja i implementacije molekularnih metoda u dijagnostici *C. trachomatis* (10,11). Zbog veće osjetljivosti u odnosu na metodu kultivacije na staničnoj kulturi ove su metode ubrzo zamijenile kultivaciju i postale zlatni standard u dijagnostici ove infekcije (12). Opisani su slučajevi nemogućnosti detekcije novih varijanti *C. trachomatis* nekim od komercijalno dostupnih testova amplifikacije nukleinskih kiselina, pa su u novije vrijeme na tržištu dostupni poboljšani testovi koji obuhvaćaju i nove varijante (13,14). Osim o ranom otkrivanju, uspjeh liječenja ovisi o izboru antimikrobnog lijeka, te je veoma važno poznavati antimikrobnu osjetljivost ovog patogena. Stoga je kultivacija u staničnoj kulturi i nadalje važna metoda dijagnostike *C. trachomatis*, ne samo u svrhu sudsko medicinskog vještačenja (izolirani soj kao dokazni materijal) i kontrole nakon provedene terapije (dokaz živog mikroorganizma), nego i u svrhu određivanja antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* (10).

SPECIFIČNOST LABORATORIJSKE METODE ODREĐIVANJA ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI *C. TRACHOMATIS*

Karakteristike testova za određivanje antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* značajno se razlikuju od standardnih postupaka određivanja antimikrobne osjetljivosti u drugih bakterija. Kako je *C. trachomatis* obvezatni unutarstanični patogen testovi antimikrobne osjetljivosti određuju sposobnost umnažanja ove bakterije u stanicama u prisutnosti različitih koncentracija antibiotika. Ovo se tradicionalno izvodi na staničnoj kulturi uz dodatak serijski razrijeđenih koncentracija antibiotika (15). Umnažanje klamidija unutar stanica nekada se detektiralo vizualizacijom unutarstaničnih inkluzija bojanjem jodom ili po Giemsi (16,17). Ova su bojenja danas napuštena te se detekcija izvodi pomoću monoklonskih protutijela obilježenih fluoresceinom (18). Određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna klamicidna koncentracija (MCC) (19). Nažalost, metoda nije standardizirana i ovisi o tipu stanične kulture, veličini inokuluma i vremenu između infekcije stanica i dodavanja antibiotika u staničnu kulturu (20). Stoga su Suchland RJ i sur. na temelju istraživanja ovih parametara dali preporuke za izvođenje ovoga testa. To su: stalna upotreba jedne vrste stanica - najreproducibilnije rezultate daje upotreba McCoy stanica; veličina inokuluma trebala bi iznositi ne manje od 5000 IFU (*engl.* inclusion forming units) po jažici mikrotitarske pločice odnosno 5-10 IFU po vidnom polju povećanja 400X; precizna definicija MIC-a i MCC-a; MIC=konzentracija antibiotika koja iznosi jedno razrijeđenje više od MIC_{TP} (*engl.* transition point) gdje je MIC_{TP} ona koncentracija antibiotika kod koje dolazi do promjene u broju i morfologiji inkluzija; MCC= koncentracija antibiotika kod koje nema pojave inkluzija nakon pasaže soja sa stanične kulture s dodatkom antibiotika na staničnu kulturu bez antibiotika i antibiotik dodati u inficiranu staničnu kulturu unutar 8 sati od infekcije (21). Osim nestandardiziranosti metode jedan od razloga što se ona ne provodi rutinski u kliničkom laboratoriju nego samo u usko specijaliziranim laboratorijima je i činjenica da se radi o tehnički zahtjevnoj, skupoj i dugotrajnoj metodi (puno pasaža uz dugotrajan biološki ciklus klamidije).

U svrhu povećanja osjetljivosti metode opisana je metoda koja se sastoji od kombinacije uzgoja na staničnoj kulturi s detekcijom živih bakterija u supernatantu pomoću molekularnih metoda. Metoda se temelji na detekciji *C. trachomatis* specifičnog transkripta DnaK pomoću RT-PCR-a (22). Vrijednosti MIC-ova dobivenih ovom metodom značajno su viši nego vrijednosti MIC-ova kada se rast *C. trachomatis* očitava imunofluorescentnom metodom.

ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST *C. TRACHOMATIS* *IN VITRO* I *IN VIVO*

Testovi antimikrobne osjetljivosti *in vitro* pokazali su da *C. trachomatis* pokazuje najniže MIC-ove na tetracikline, makrolide, fluorokinolone i rifampin, dok puno veće vrijednosti MIC-ova pokazuju penicilinski antibiotici (16, 22-26). I unutar pojedine skupine antibiotika postoje manje razlike u učinkovitosti. Tako doksiciklin pokazuje manje MIC-ove od oksitetraciklina (27), u skupini makrolida najučinkovitiji je čini se klaritromicin, a slijede azitromicin i eritromicin, dok u skupini fluorokinolona ofloksacin pokazuje nešto manje MIC-ove od ciprofloksacina (22).

I klinička istraživanja pokazala su da najbolji odgovor u bolesnika (nestanak simptoma, negativan kontrolni bakteriološki nalaz) pokazuju navedene skupine antibiotika (27-29). Stoga se tetraciklini, makrolidi i kinoloni uobičajeno se primjenjuju za liječenje infekcije *C. trachomatis* i dio su preporuka Centra za kontrolu i prevenciju bolesti SAD-a (engl. Centers for Disease Control and Prevention, CDC)-a za liječenje ovih infekcija (30). Jedna od najnovijih izmjena u ovim preporukama je i uporaba azitromicina kao antibiotika izbora u liječenju trudnica, dok je do nedavno to bila uporaba amoksicilina. Kako su novije studije dokazale sigurnost i netoksičnost uporabe azitromicina u trudnica (31), novije preporuke su logičan izbor s obzirom na mehanizam djelovanja penicilinskih antibiotika na *C. trachomatis* (dopuštaju konverziju elementarnih tjelešaca u retikularna, ali inhibiraju replikaciju retikularnih tjelešaca što potiče pitanje moguće indukcije perzistentne infekcije) (22). Rezistencija na makrolide, fluorokinolone i rifampin se može inducirati *in vitro* kultivirajući *C. trachomatis* uz dodatak subinhibitornih koncentracija antibiotika (32-

35). Iako se u *in vitro* studijama pokazao kao jedan od najaktivnijih antibiotika, rifampin se ne preporuča u rutinskom liječenju *C. trachomatis* infekcija zbog njegove sklonosti k brzom razvoju rezistencije (34,36,37).

Čini se da je rezistencija *in vivo* na tetracikline, makrolide i kinolone rijetka, ali sigurna pojava. Nekoliko studija opisalo je izolaciju multirezistentnih sojeva *C. trachomatis* u neuspješno liječenih bolesnika s infekcijom spolno mokraćnog sustava. Jones i sur. 1990 g. opisali su 5 bolesnika (od kojih je u 4 postojala sumnja na neuspjeh liječenja) u kojih je izolirana *C. trachomatis* rezistentna (MIC \geq 8 μ g/mL) na teraciklin, doksiciklin i eritromicin, i osjetljiva na ofloksacin (38).

Nadalje, Lefevre i sur. 1997 g. opisuju rezistentni soj na teraciklin (MIC i MCC $>$ 64 μ g/ml) izoliran u simptomatskog bolesnika nakon neuspješnog liječenja ovim antibiotikom (39). 2000.-te godine Smani i sur. opisuju 3 bolesnika inficirana rezistentim sojem *C. trachomatis* (MCC $>$ 4 μ g/mL) na doksiciklin, ofloksacin i azitromicin. U dvoje od njih radilo se o neuspješnom liječenju dok je treći bila supruga jednog od inficiranih (40). Svi ovi do sada opisani izolirani rezistentni klinički sojevi pokazuju tzv. „heterotipnu rezistenciju“ tj. onu u kojoj veoma mali broj bakterija preživljava vrlo visoke antimikrobne koncentracije (~1% bakterijske populacije). Točnije, termin „heterotipne rezistencije“ odnosi se na pojavu heterogene populacije rezistentnih i osjetljivih bakterija dobivene subkultivacijom jednog rezistentnog mikroorganizma izoliranog u hranilištu s antibiotikom. Nasuprot tome je pojam „homotipne rezistencije“ koji se odnosi na pojavu homogene klonalne populacije rezistentnih mikroorganizama dobivenih subkultivacijom jednog rezistentnog mikroorganizma. (41). Do danas nije opisana „homotipna rezistencija“ u izolata izoliranih u ljudi (21), ali je opisana u sojeva *C. trachomatis* izoliranih iz svinja (42). Za sada je nepoznata korelacija između rezultata antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* dobivene laboratorijskim testovima *in vitro* i kliničkog ishoda liječenja (43) budući da je „heterotipna rezistencija“ opažena i u bolesnika s uspješno izliječenom akutnom klamidijском infekcijom kao i u neuspješno liječenih bolesnika s rekurentnom i perzistentnom infekcijom (21,40).

U zaključku, procjena antimikrobne rezistencije *in vitro* i ishoda liječenja infekcije *C. trachomatis* otežana je nedostatkom standardizacije testova kao i činjenicom da *in vitro* rezistencija ne mora korelirati s kliničkim ishodom. *In vitro* rezistencija *C. trachomatis* pojavljuje se u obliku „heterotipne rezistencije“, te je danas jedan od glavnih izazova znanstvenika razjasniti kliničku implikaciju ovog tipa rezistencije (42). Zbog svega navedenog, neuspješno liječenu infekciju spolno-

mokraćnog sustava uzrokovanu *C. trachomatis* preporuča se potvrditi ili isključiti dijagnostičkom metodom izolacije na staničnoj kulturi te izolirane sojeve prosljediti u specijalizirani laboratorij koji će po mogućnosti primijeniti testove antimikrobne osjetljivosti *C. trachomatis* (20).

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes: ne postoji.

LITERATURA

- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Surveillance 2005. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2006.
- Sternak SL, Kružić V, Vilibić Čavlek T, Škerk V. *Chlamydia trachomatis* infection in Croatian symptomatic and asymptomatic men. Journal of men's health & gender 2006; 3:80-1.
- Škerk V, Markovinović L, Zekan S, Jakšić J, Židovec Lepej S, Markotic A, Škerk V, Radošević V, Cvitković L, Begovac J. The significance of *Chlamydia trachomatis* in urethritis and prostatitis - differences in therapeutic approach – Croatian experience. J Chemother 2009; 21:63-7.
- Ujević B, Habek JC, Habek D. Prevalence of infection with *Neisseria gonorrhoeae* or *Chlamydia trachomatis* in acute mucopurulent cervicitis. Arh Hig Rada Toksikol 2009; 60:197-203.
- Hiršl-Hečej V, Šikanić-Dugić N, Domljan LM, Pustišek N, Kani D, Žele-Starčević L. *Chlamydia trachomatis* u adolescentica i mladih žena. U: Knjiga sažetaka 9-og simpozija o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama, Opatija, Hrvatska, 2007. Sažetak 33, str.40-1. Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a, Zagreb, Hrvatska, 2007.
- Hiršl-Hečej V, Pustišek N, Sikanić-Dugić N, Domljan LM, Kani D. Prevalence of Chlamydial genital infection and associated risk factors in adolescent females at an urban reproductive health care center in Croatia. Coll Antropol 2006; 30 (Suppl 2):131-7.
- Schachter J, Stoner E, Moncada J. Screening for chlamydial infections in women attending family clinics. West J Med 1983; 138:375-9.
- Stamm WE, Cole B. Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* urethritis in men. Sex Transm Dis 1986; 13:163-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. MMWR 2006; 55 (No.RR-11):38.
- Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections-2002. MMWR 2002; 51 (No.RR-15):3.
- Fredlund H, Falk L, Jurstrand M, Unemo M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. APMIS 2004; 112:771-84.
- Martin DH, Nsuami M, Schachter J, Hook III WE, Ferrero D, Quinn TC, Gaydos C. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient “gold standard” in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. J Clin Microbiol 2004; 42:4749-58.
- Ripa T, Nilsson PA. *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. Sex Transm Dis 2007; 34:255-6.
- Reischl U, Straube E, Unemo M. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organized by INSTAD e.V., Germany. Euro Surveill 2009; 14:1-4.
- Ridgway GL, Owen JM, Oriol JD. A method for testing antibiotic susceptibility of *C. trachomatis* in a cell culture system. J Antimicrob Chemother 1976; 2:77-81.
- Lee CK, Bowie WR, Alexander ER. In vitro assay of the efficacy of antimicrobial agents in controlling *Chlamydia trachomatis* propagation. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13:441-5.
- Stirling P, Richmond S. The developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* in McCoy cells treated with cytochalasin B J Gen Microbiol 1977; 100:31-42.
- Ehret JM, Judson FN. Susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis*: from eggs to monoclonal antibodies. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:1295-9.
- Ridgway GL, Owen JM, Oriol JD. The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. Brit J Vener Dis 1978; 54:103-6.
- Essig A. *Chlamydia* and *Chlamydophila*. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM press, Washington, 2007:1021-35.
- Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:636-42.

22. Cross NA, Kellock DJ, Kinghorn GR, Taraktchoglou M, Batak E, Oxley KM, Hawkey PM, Eley A. Antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis* using a reverse transcriptase PCR-based method. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2311-3.
23. Trehan JD, Yearsley PJ, Ballard RC. In vitro studies of *Chlamydia trachomatis* susceptibility and resistance to rifampin and rifabutin. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1393-4.
24. Martens MG, Faro S, Maccato M, Riddle G, Hammill H, Wang Y. In vitro susceptibility testing of clinical isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Dis Obstetr Gyn* 1993; 1:40-5.
25. Rice RJ, Bhullar V, Mitchell SH, Bullard J, Knapp JS. Susceptibilities of *Chlamydia trachomatis* isolates causing uncomplicated genital tract infections and pelvic inflammatory disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:760-2.
26. Jones RB, Van Der Pol B, Johnson RB. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(Suppl B):63-5.
27. Johansson G, Sernryd A, Lycke E. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to antibiotics in vitro and in vivo. *Sex Trans Dis* 1979; 6:50-7.
28. Škerk V, Krhen I, Lisić M, Begovac J, Roglić S, Škerk V, Ljubin Sternak S, Banaszak A, Strugar-Šuica J, Vuković J. Comparative randomized pilot study of azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of prostate infection caused by *Chlamydia trachomatis*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:188-91.
29. Škerk V, Ljubin Sternak S, Roglić S, Škerk V, Lisić M. Diagnosis and treatment of chronic prostatitis caused by *Chlamydia trachomatis*. *J Chemoter* 2005; 17: 570-1.
30. Van Vranken M. Prevention and treatment of sexually transmitted disease: an update. *Am Fam Physician* 2007;76(12):1827-32.
31. Pitsouni E, Iavazzo C, Athanasiou S, Falagas ME. Single-dose azithromycin versus erythromycin or amoxicillin for *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:213-21.
32. Dessus-Babus S, Bebear CM, Charron A, Bebear C, de Brébeyrac B. Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2474-81.
33. Dreses-Werringloer U, Padurbin I, Jurgens-Saathoff B, Hudson AP, Zeidler H, Kohler L. Persistence of *Chlamydia trachomatis* is induced by ciprofloxacin and ofloxacin in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3288-97.
34. Dreses-Werringloer U, Padurbin I, Zeidler H, Kohler L. Effects of azithromycin and rifampin on *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3001-8.
35. Morrissey I, Salman H, Bakker S, Farrell D, Bebear CM, Ridgway G. Serial passage of *Chlamydia* spp. in sub-inhibitory fluoroquinolone concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:757-61.
36. Smelov V, Krylova T, Smelova N, Norman L. Azithromycin treatment follow-up: antibacterial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23S1: S79-82.
37. Siewert K, Rupp J, Klinger M, Silbach W, Gieffers J. Growth Cycle-dependent pharmacodynamics of antichlamydial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1852-6.
38. Jones RB, Vander Del Pol B, Martin DH, Shepard MK. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 162:1309-15.
39. Lefevre JC, Lepargneur JP, Guion D, Bei S. Tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* in Toulouse, France. *Pathol Biol* 1997; 45:376-8.
40. Somani J, Bhullar VA, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* 2000; 181:1421-7.
41. Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional region and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1616-23.
42. Andersen AA, Rogers KG. Resistance to tetracycline and sulfadiazine in swine *C. trachomatis* isolates. U: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, Clarke NI, Grayston JT, Rank RG, Ridgeway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE, ur. Chlamydial infections. Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection. Napa, Calif, June 21-26,1998. Berkley University Press, Berkley, California,1998:313-6.
43. Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH, Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*. A meeting report. *J Infect Dis* 2005; 191:917-23.

Determining antimicrobial resistance to *Chlamydia trachomatis* and applying present findings in daily practice

Sunčanica Ljubin Sternak¹, Višnja Škerk²

¹ Chlamydial Unit, Microbiology Service, Croatian National Institute of Public Health, ² Referral Centre of Ministry of Health of Republic Croatia for Urogenital Infections, Clinic for Infectious Diseases " Dr. Fran Mihaljević"; Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) is the most common bacterial causative agent of sexually transmitted diseases today. Treatment outcome will depend on the choice of antimicrobial drug. Therefore, it is very important to know antimicrobial sensitivity of this pathogen. Cultivation in cell culture is a method of choice for diagnosis of *C. trachomatis* infection, in terms of medico-legal investigations and follow-up after completed therapy, but also serves for determining the antimicrobial sensitivity of *C. trachomatis*. Tetracyclines, macrolides and kinolones are commonly used in the treatment of the *C. trachomatis* infection. Resistance to these antibiotics was described for strains isolated from unsuccessfully treated patients. All described resistant clinical strains demonstrated *in vitro* heterotypic resistance. To date no homotypic resistance was described for human isolates. An evaluation of antimicrobial resistance and treatment outcome in *C. trachomatis* infection is complicated by the lack of standardized tests, as well as by the fact that *in vitro* resistance does not correlate with clinical outcome. In case of any suspicion of unsuccessful treatment of genitourinary infection caused by *C. trachomatis* isolation should be attempted and isolated strains forwarded to a specialized laboratory.

Key words: *C. trachomatis*, cultivation, heterotypic resistance

Original submission: 03 September 2009.; **Revised submission:** 08 December 2009; **Accepted:** 09 December 2009.

Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in the community

Branka Bedenić^{1,2}, Jasmina Vraneš^{1,3}, Zrinka Bošnjak², Tatjana Marijan³, Ana Mlinarić-Džepina³, Tamara Kukovec⁴, Jasna Knežević³, Maja Anušić³, Nataša Beader^{1,2}, Petra Barl⁵, Vladimira Leskovar³, Smilja Kalenić^{1,2}

¹Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ²Klinički bolnički centar Zagreb, ³Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb, ⁴Zavod za javno zdravstvo varaždinske županije, Varaždin, ⁵Student Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; Hrvatska

ABSTRACT

Aim Molecular characterization of ESBL-producing *K. pneumoniae* strains isolated from urine of outpatients in Zagreb region during the last five years.

Methods During the five-year study period a total of 2,651 *K. pneumoniae* strains were isolated from urine of nonhospitalized patients with significant bacteriuria. ESBL production was detected by double-disk diffusion technique and by ≥ 3 -dilution reduction in the minimal inhibitory concentration of ceftazidime in the presence of clavulanate. A total of 441 ESBL-producing *K. pneumoniae* strains (15.5%) were collected and 17 strains were further characterised.

Double-disk synergy test was used to detect ESBLs. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution method according to CLSI. The transferability of ceftaxime resistance was tested by conjugation (broth mating method). PCR was used to detect alleles encoding ESBL enzymes. The genotypes of the strains were compared by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Xba*I-digested genomic DNA.

Results A significant difference in frequencies of ESBL isolates was observed. In the first year of study only 4.9% of isolated strains were ESBL producers, while in the second year 17.3% ESBL-positive strains were detected ($p < 0.01$), and the frequency remained stable within following years. All strains yielded an amplicon with primers specific for SHV β -lactamases and CTX-M β -lactamases. Based on sequencing of *bla*_{CTX-M} genes enzymes of nine strains were identified as CTX-M 15 β -lactamase and three as CTX-M-14. Isolates were not clonally related.

Conclusion The study demonstrated community-associated emergence of CTX-M 1 β -lactamase-producing *K. pneumoniae* strains.

Key words: community-acquired urinary tract infections, ceftaxime, extended-spectrum β -lactamase (ESBL, CTX-M 15 β -lactamase, CTX-M-14 β -lactamase

Corresponding author:

Branka Bedenić,
Klinički zavod za kliničku i molekularnu
mikrobiologiju,
Klinički bolnički centar Zagreb,
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, Hrvatska
Phone: +385 1 492 0026
Fax: +385 1 459 0130
E-mail: branka.bedenic@zg.t-com.hr

Original submission:

30 October 2009;

Accepted:

09 December 2009.

INTRODUCTION

Since plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) were first detected in *Klebsiella oxytoca* isolate in 1983 in Germany, they have been increasingly reported worldwide (1). Production of ESBLs is the major mechanism of resistance to oxymino-cephalosporins and aztreonam in Gram-negative bacteria (1-2). ESBLs are predominantly derivatives of plasmid-mediated TEM or SHV β -lactamases and arise through mutations that alter the configuration of the active site, thereby expanding the hydrolytic spectrum of the enzyme (3). The CTX-M family of β -lactamases groups evolutionary related ESBLs with a much higher level of activity against cefotaxime than ceftazidime; and their similarity to some species-specific β -lactamases, like those of *Klebsiella oxytoca* and *Citrobacter diversus*, has been known for years (4-5). The recent finding of 99% homology between the CTX-M-2 enzyme and the β -lactamase of *Kluyvera ascorbata* has indicated the origins of at least a fraction of the CTX-M-variants (6). In contrast to TEM and SHV- ESBLs which rely on point mutations in *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes to expand their substrate profiles, CTX-M β -lactamases have an intrinsic extended-spectrum profile. Whereas only three enzymes of this family (CTX-M-1, MEN-1, CTX-M-2, and Toho-1) were described between 1990 and 1995, in recent years the list has been increasing very quickly (6). In some countries CTX-M β -lactamases are the most prevalent types of ESBLs, for instance in Russia (7), Greece (8), Spain (9), Switzerland (10), Japan (11), Taiwan (12), China (13) and Argentina (14).

Recently an increase in the prevalence of ESBL producing *K. pneumoniae* was observed in Zagreb Institute of Public Health. Very little data regarding the molecular epidemiology of community acquired ESBLs in Croatia are available. The majority of strains showed unusual resistance phenotype with no inhibition zones around cefotaxime disks, consistent with the production of CTX-M β -lactamases. The aim of this study was to determine the prevalence and molecular epidemiology of CTX-M β -lactamases in community population in Zagreb region.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Fourteen isolates from 2005 and 4 from 2007 were selected for further study. Isolates were collected from urine of non-hospitalised patients with significant bacteriuria.

Detection of ESBL

ESBL production was determined by double-disk synergy test (DDST) and confirmed by at least threefold reduction in ceftazidime minimum inhibitory concentration (MIC) by clavulanate (15). For DDST, an overnight broth culture of test strain was diluted in saline, adjusted to McFarland standard suspension 0.5 and inoculated onto Mueller-Hinton (MH) agar. Disk containing amoxicillin/clavulanate (20/10 μ g) was placed in the middle of the plate and surrounded by disks containing ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone and aztreonam (30 μ g). Plates were incubated overnight at 37°C. Distortion of the inhibition zones around cefalosporine disks toward co-amoxiclav disk was indicative of ESBL production. ESBL production was confirmed by CLSI combined disk test and by 8 fold reduction in ceftazidime MIC in the presence of clavulanate.

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibilities to a wide range of antibiotic were determined by disk diffusion and broth microdilution method in MH broth and 96 well microtiter plates according to CLSI (16).

A phenotype consistent with production of a CTX-M-type β lactamases was defined by cefotaxime MIC \geq 8-fold higher than the ceftazidime MIC, with the MICs of both agents reduced significantly (again \geq 8-fold) in the presence of 4 mg/L clavulanic acid.

Transfer of resistance determinants

K. pneumoniae isolates were investigated for the transferability of their resistance determinants. Conjugation experiments were set up employing *E. coli* A15 R⁻ strain free of plasmids and resistant to rifampicin (17). Overnight BHI (Brain-Heart Infusion) broth cultures of *K. pne-*

umoniae donor strain and *E. coli* recipient strain were mixed in the ratio 1:2 in 5 ml BHI broth and incubated 18 h at 37 °C without shaking. Transconjugants were selected on the combined plates containing cefotaxime (1 mg/L) and rifampicin (256 mg/L). The frequency of conjugation was expressed relatively to the number of donor cells.

Characterization of extended-spectrum β -lactamases

The presence of *bla*_{ESBL} genes was determined by polymerase chain reaction (PCR) using primers targeting *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and conditions as described previously (18-20). Bacterial DNA was extracted by the boiling method. PCR mix (50 μ l) contained: 21 μ l of ultrapure water, 25 μ l of master mix (Roche), 1 μ l of each primer and 2 μ l of template DNA. PCR was performed under the following conditions: 94° for 3 min, the 35 cycles consisting of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 45 s each, followed by a final extension at 72°C for 5 min. Primers used in this study were: MN-1 (5' CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3') and MN-2 (5' TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3')(18) for detection of SHV β -lactamases, OT-3 (5'-ATG-AGT-ATT-CAACAT-TTC-CG-3') and OT-4 (CCA-ATG-CTT-AAT-CAG-TGA-GG-3') for detection of TEM (19) β -lactamases, MA-1 (5'-SCS-ATG-TGC-AGY-ACC-AGT-AA-3') and MA-2 (5'-CGC-CRA-TAT-GRT-TGG-TGG-TG-3') (20) for detection of CTX-M β -lactamases, and PER-1-F (5'GGG- ACA -(A/G) TC- (G/C)(G/T)-ATG-AAT-GTC A and PER-1R: 5' gg (C/T) (G/C) GCT-TAG ATA-GTG-CTG-AT (21) for detection of PER β -lactamases. Strains were further tested by multiplex PCR with primers specific for CTX-M groups 1, 2, 8, 9 and 25 (22). Primers IS26F (5'-GCG-GTA-AAT-CGT-GGA-GTG-AT-3) and IS26R (5'-ATT-CGG-CAAGTT-TTT-GCT-GT-3') were used to amplify 400 bp fragment spanning the link between IS26 insertion sequence and *bla*_{CTX-M} gene in CTX-M producing isolates (23). Primers ISEcp1L1 (CAGCTTTTATGACTCG) and ALA-5 (CCTAAA-TTCCACGTGTGT) were applied to amplify the ISEcp1 insertion sequence (23).

Reference strains producing CTX-M-15 and CTX-M-2 β -lactamases were provided by Neil Woodford from Health Protection Agency, London,UK. The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis, after staining with ethidium bromide. Amplicons were then column-purified (Quiagen DNA purification kit) and sequenced directly using the ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems). After sequencing the PCR products obtained, we used the BLAST program to look for sequence homology with the other *bla*_{ESBL} genes. More specific primers for each cluster of the CTX-M-family were then used to amplify the entire coding sequence of the *bla*_{CTX-M} gene. Reference strains producing CTX-M-15 and CTX-M-2 β -lactamases were provided by Neil Woodford (Health Protection Agency, London,UK). Reference strains producing TEM-1, TEM-2 and SHV-1 β -lactamase were kindly provided by Prof. A. Bauernfeind (Microer, Munich, Germany).

PCR *Nhe* test was performed to distinguish between SHV-1 and SHV-ESBL. The PCR products of *bla*_{SHV-ESBL} genes are cleaved in three fragments of 1017, 770 i 247 bp as described previously (18) in contrast to *bla*_{SHV-1} which is not digested by *NheI* restriction endonuclease. 10 μ l of the PCR product was mixed with 1 μ l of *Nhe* enzyme, 2 μ l of buffer and 10 μ l pf water. The samples were incubated for 2 h at 37 °C in water bath. The fragments were detected after electrophoresis in 1% agarose gel, after staining with ethidium bromide.

Molecular typing of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis

Isolates were compared by PFGE of *Xba* I-digested genomic DNA as described previously. Isolation of chromosomal DNA was performed as described by Kaufman et al (24). For each isolate 1,0 ml (optical suspension density 0,6-0,7 at 540 nm) of an overnight culture grown in BHI broth was pelleted by centrifugation at 10 000 rpm for 2 min. After being washed in 1 ml SE buffer (75mM NaCl; 25mM EDTA, *Sigma*), bacteria were resuspended in 500 μ l SE buffer with 10 μ l lysosime (*Boehringer Mannheim GmbH*) Next, 500 μ l of this bacterial suspension was mixed with 500 μ l 2,0% low- melting-temperature aga-

Table 1. Distribution of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* strains

Year	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Total No of isolates (%)
	No of ESBL isolates (%)	No of non ESBL isolates (%)	
2003	27 (1,02)	520 (19,60)	547 (20,62)
2004	96 (3,62)	460 (17,34)	554 (20,96)
2005	94 (3,54)	215 (8,10)	309 (11,64)
2006	109 (4,11)	493 (18,58)	602 (22,69)
2007	114 (4,29)	525 (19,80)	639 (24,09)
Total	440 (16,58)	2213 (83,42)	2651 (100,00)

rose (InCert agarose; FMC Bioproducts) and left to solidify. Solid agarose plugs were then incubated for 24h at 56⁰ C in 2ml of ESP buffer (1% N-lauril sarcosine; 0,5 M EDTANA₂, pH 9,5; 500 µg/ml proteinase K, Sigma). After 24h, the plugs were incubated at the room temperature for 2 h in PMSF (phenylmethanesulfonyl-fluoride, Aldrich) and then were bedded three times for 30 min at 4⁰ C with TE buffer (10mM Tris-Hcl, pH 8, 0,1 mM EDTA, Sigma) before macrorestriction with 10U / 1 µl XbaI for 3 h at 37⁰ C. Restriction fragments of DNA were separated by PFGE with a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad Laboratories) through 1% pulsed-field certified agarose (Bio-Rad) at a field strength of 6 V/cm for 20 h at 11⁰ C; with pulses from 5 to 50 -s in 0,5 TBE buffer with thiurea (50mM, Sigma). A lambda ladder (Roche) was used as the molecular size marker. After electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide, rinsed, and photographed under UV light. The PFGE patterns were compared following the criteria of Tenover and colleagues

for bacterial strain typing (25) and analysed by computer software (GelComparII). The patterns obtained were compared by clustering methods (unweighted pair group method with arithmetic averages) using the Dice coefficient. An optimization of 0,50% and position tolerance of 3,00% were applied during the comparison of PFGE fingerprinting patterns.

RESULTS

A dramatic increase in the prevalence of ESBL positive *K. pneumoniae* was observed between 2003 (4.9%) and 2007 (17.8%) as shown in Table 1. Very high prevalence of ESBLs persisted from 2004 till 2007.

ESBLs were detected in all tested strains by DDST and confirmed by >3 fold decrease of ceftazidime MICs by clavulanate.

All strains were uniformly resistant to amoxicillin and narrow and expanded-spectrum cephalosporins (Table 2). Isolates belonging to group 1 CTX-M β-lactamases were resistant to gentamicin, netilmicin and ciprofloxacin. Three strains producing CTX-M-2 group showed susceptibility to ceftazidime, gentamicin, netilmicin and ciprofloxacin.

Strains isolated in 2002-2003 were susceptible to piperacillin/tazobactam and susceptible or intermediate susceptible to amoxicillin/clavulanate

Table 2. Minimum inhibitory concentrations of *Klebsiella pneumoniae* isolates from 2002-2003 and 2007*

a. 2002-2003

Strain	AMX	CN	CXM	CAZ	CTX	FEP	FOX	AMC	CAZ/cl	TZP	IMI	GM	NET	AMI	CIP
19	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	16	0.12	2	0.25	1	0.5	8	1
22	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	8	0.12	2	0.25	1	0.5	4	0.12
34	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	4	0.06	4	0.5	2	4	128	0.25
48	>128	>128	>128	>128	>138	>128	8	16	0.5	64	0.5	64	32	8	128
49	>128	128	32	>128	32	8	8	8	1	16	0.25	0.5	0.5	1	0.12
50	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	8	0.5	16	0.25	32	32	64	0.03
51	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	16	1	16	0.25	64	16	2	64
53	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	16	1	16	0.5	64	32	8	64
57	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	16	1	16	0.5	128	64	32	>128
61	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	16	2	16	0.5	128	32	8	128
65	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	16	1	16	0.25	64	32	4	128
67	>128	>128	>128	64	>128	>128	8	16	2	16	0.25	128	64	8	64
69	>128	>128	>128	64	>128	>128	8	16	2	16	0.25	128	64	4	128

b. 2007

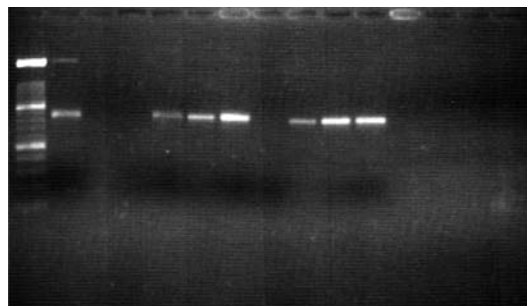
Strain	AMX	CN	CXM	CAZ	CTX	FEP	FOX	AMC	CAZ/cl	TZP	IMI	GM	NET	AMI	CIP
22598	>128	>128	>256	>256	>256	>128	32	128	4	>128	0.5	128	32	4	128
23857	>128	>128	>256	>256	>256	>128	32	64	0.5	128	0.25	8	4	4	256
4986	>128	>128	>256	128	>256	>128	16	64	0.25	64	1	0.5	0.5	1	32
7590	>128	>128	>256	256	>256	>128	32	128	2	128	0.25	128	64	4	256

*AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CAZ/cl-ceftazidime/clavulanic acid; CXM, cefuroxime; CN, cephalexin; CAZ, ceftazidime; CAZ/cl, ceftazidime/clavulanic acid; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; FOX, cefoxitin; AMT, aztreonam; TZP, piperacillin/tazobactam; MEM, meropenem; GM, gentamicin; NET, netilmicin; AMI, amikacin; CIP, ciprofloxacin

contrary to the strains collected in 2007 which showed resistance to β -lactam combinations with inhibitors. Resistance to imipenem was not observed as shown in Table 2. Interestingly the strains from 2007 showed reduced susceptibility or resistance to cefoxitin unlike those from 2002-2003.

Six out of 13 isolates collected in 2002-2003 transferred resistance to *E. coli* recipient. Resistance to gentamicin and netilmicin was cotransferred alongside with cefotaxime resistance from four strains. Tranconjugants showed similar resistance phenotype to expanded-spectrum cephalosporins as their respective donors. Only one isolate from 2007 transferred cefotaxime resistance to recipient strain with the frequency of 10^{-4} . Gentamicin resistance was cotransferred.

All isolates yielded an amplicon of 545 bp with consensus MA primers (Figure 1). Multiplex PCR was positive for group 1 of CTX-M β -lactamases in all except three strains. Three strains (19,22,34) collected in 2005 yielded an amplicon with group 2 primers. Sequencing of selected amplicons belonging to group 1 revealed the presence of *bla*_{CTX-15/28} with coding regions containing identical nucleotide sequences. The obtained DNA sequence of the PCR products exhibited 98% similarity with *bla*_{CTX-M-15} from the gene bank. Three strains were positive for group 2 CTX-M β -lactamases and were identified by sequencing of *bla* genes as CTX-M-14. PCR-*Nhe* test was negative indicating the presence of naturally occurring SHV-1 β -lactamase. TEM β -lactamases were detected in 8 strains (19, 22,



Lane
 1. *E. coli*-CTX-M-15-positive control
 2. *E. coli* ATCC 25922-negative control
 3. *K. pneumoniae* 48
 4. *K. pneumoniae* 51
 5. *K. pneumoniae* 61
 6. empty lane
 7. *K. pneumoniae* 65
 8. *K. pneumoniae* 67
 9. *K. pneumoniae* 69

Figure 1. Multiplex PCR for detection of CTX-M groups

34, 57, 61, 65, 67 and 69). Clinical isolates of *K. pneumoniae* yielded an amplicon of 1016 bp with primers specific for SHV β -lactamases.

IS26 insertion sequence was found upstream of the *bla*_{CTX-M-15} gene. *ISEcpI* was not found.

The isolates showed distinct PFGE fingerprints. No clonal relatedness was observed among the isolates.

DISCUSSION

The results of this work provided insights into the molecular epidemiology of the community spread of ESBLs positive *Klebsiella pneumoniae*. The study found CTX-M-15 β -lactamase to be the most prevalent among isolates of *K. pneumoniae*. This type of CTX-M β -lactamase is the most prevalent around the world and was previously reported in our neighbouring countries such as Hungary (26), Austria (27), Slovenia (28) and Italy (29). It was for the first time described in New Delhi, India in 1999 (30). CTX-M-15 is also predominant in Switzerland (10), Bulgaria (31), and in France (32). Previous studies also found CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamase among hospital isolates of *E. coli* from Croatia (33,34). CTX-M-15 differs from CTX-M-3 β -lactamase by a single amino-acid change (Asp-240-Gly). While these genes were found in all isolates, other rare types of ESBLs like WEB or IBC cannot be excluded without further testing, but were beyond this study. The spread of CTX-M-15 β -lactamase was not due to clonal dissemination of related isolates as expected for community isolates. Characterization of plasmids is necessary to be determined if dissemination of CTX-M-15 β -lactamase is due to the horizontal transfer of plasmids containing *bla*_{CTX-M-15} genes.

Carbapenems are frequently the only therapeutic option available for treatment of severe infections caused by multiresistant ESBL producing *K. pneumoniae* isolates described in this work. Nevertheless, universal susceptibility to these last-line antimicrobials is no longer guaranteed. Resistance to ceftazidime observed in all strains is consistent with the production of CTX-M-15 β -lactamase which efficiently hydrolyze ceftazidime similarly as CTX-M-16 and CTX-M-28. These data suggest that phenotypic approach based on comparison of cefotaxime and ceftazi-

zidime MICs has a limited value in predicting the presence of CTX-M-ESBLs in clinical isolates. All strains were susceptible to combination of ceftazidime and clavulanate, but in general, β -lactam combinations with inhibitors are not recommended for the therapy of serious infections caused by ESBL producing bacteria due to pronounced inoculum effect and possibility of developing mutants hyperproducing ESBL during the therapy (35). The strains displayed intermediate susceptibility or resistance to cefepime. The fluctuations in the level of cephalosporin resistance most probably reflects the variable levels of *bla*_{CTX-M} gene expression as previously reported for TEM and SHV-ESBLs (36,37). The strains with increased resistance could have the mutations in the promoter region, more gene copies or higher plasmid copy number. Associated aminoglycoside and fluoroquinolone resistance is frequent in ESBL producing bacteria. Some of the strains were resistant to ceftazidime but resistance was not transferable to *E. coli* recipient indicating chromosomal origin of the resistance gene. Concerning non β -lactam susceptibilities of CTX-M producers, all strains were resistant to ciprofloxacin. High rates of resistance to ciprofloxacin in CTX-M producers were also reported from Austria (27), Canada (38) and Italy (29). Coresistance to non β -lactam antibiotics is also frequent, either by the cotransfer of the resistance determinants in the same genetic elements (such as aminoglycosides resistance) or simply by the coselection of both resistance mechanism, as it occurs in fluoroquinolones.

REFERENCES

- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Toixdorf-Neutzling RM, Wiedeman B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-7.
- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14: 933-51.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-92.
- Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:52-9.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
- Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:151-9.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3724-32.

Since plasmids encoding ESBLs also contain resistance genes for aminoglycosides it is possible that consumption of these antibiotics could also exert the selection pressure which favours the spread of plasmids with ESBL genes.

A number of risk factors have been identified as linked with the acquisition of community-acquired infections involving ESBL-positive isolates. The risk factors are a previous hospitalization or antibiotic therapy, within the past three months, old age (>60), male gender, confinement to bed with debilitation and urinary catheterization (39,40). The emergence of CTX-M enzymes in Croatia and elsewhere highlights the importance of using either both ceftazidime and cefotaxime, or cefpodoxime to detect possible ESBL production prior to performing cephalosporin-clavulanate synergy tests for confirmation (41).

This demonstrates the need to monitor both hospitalized and general practice patients for further emergence of transferable resistance to expanded-spectrum cephalosporins. Continuous surveillance in order to track CTX-M-producing *K. pneumoniae* in the community is necessary to prevent their influx into the hospitals. The appearance of CTX-M-15 β -lactamase in the community is a serious threat to public health.

ACKNOWLEDGEMENT/DISCLOSURE

The study was supported by Croatian Ministry of Science, Education and Sport, Grant No: 108-1080-0015 and 121-1080114-0306..

Competing interests: none declared.

8. Pournaras S, Ikonomidis A, Kristo I, Tsakris A, Maniatis A. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:574-5.
9. Canton R, Oliver A, Coque TM. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12 year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1237-43.
10. Lartigue MF, Zinsius C, Wenger A, Bille J, Poirel L, Nordman P. Extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2855-60.
11. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo- β -lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:631-8.
12. Yu WL, Winokur P, Von Stein DL. First description of CTX-M- β -lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1098-100.
13. Chanawong A, M'Zalli FH, Heritage J. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14 among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:630-7.
14. Quinteros M, Radice M, Gardella N. Extended-spectrum β -lactamases in Buenos Aires, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2864-7.
15. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2007.
17. Elwell LP, Falkow S. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2nd ed. Baltimore MD: Williams and Wilkins, 1986: 683-721.
18. Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:398-402.
19. Arlet G, Brami G, Decre D. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-8.
20. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:735-43.
21. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2523-9.
22. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Development of a multiplex PCR assay for genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (Suppl. 2):121.
23. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209:161-8.
24. Kaufman ME. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Woodford N, Johnsons A, eds. *Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications*. 1st ed. New York: Humana Press Inc. Totowa, 1998:33-51.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
26. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:165-74.
27. Eisner A, Fagan EJ, Feierl G, Kessler HH, Marth E, Livermore DM, Woodford N. Emergence of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M extended-spectrum β -lactamase in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:785-7.
28. Meglič KM, Koren S, Palepu MFI, Karisik E, Livermore DM, Pike R, Andolovic A, Jeverica S, Križan-Hergouth V, Müller-Premru M, Seme K, the Slovenian ESBL Study Group, Woodford N. Nationwide Survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:287-91.
29. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, Stefani S, Toniolo A, and Rossolini GM. CTX-M- type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2700-6.
30. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcpI*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201:237-41.
31. Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, Bauernfeind A. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Sofia, Bulgaria. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:752-4.
32. Lavigne J, Marchandin PH, Delmas J, Bouziges N, Lecallion E, Cavalie I, Jean Pierre H, Bonnet R, Sotto A. QnrA in CTX-M producing *Escherichia coli* from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:4224-8.

33. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I, Katić S, Kalenić S, Kaufmann ME, Woodford N, Punda-Polić V. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007; 19:97-100
34. Literacka E, Bedenić B, Baraniak A, Fiett J, Tonkić M, Jajić-Bencić I, Gniadkowski M. Bla_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new ($bla_{CTX-M-3}$) and widely spread ($bla_{CTX-M-3a}$, $bla_{CTX-M-15}$) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1630-5.
35. Essack S. Treatment options for extended-spectrum β -lactamase producers. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190:181-4.
36. Wu PJ, Shannon KP, Phillips I. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:927-9.
37. Xiang X, Shannon K, French G. Mechanisms and stability of hyperproduction of the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:525-32.
38. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:52-9.
39. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.
40. Borer A, Gilad J, Menasche G, Pelled N, Riesenberg K, Schlaeffner F. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in Southern Israel. *Medical Science Monitor* 2002; 8:CR44-7.
41. Winstanley TG, Ridgway EJ, Parys BT, Woodford N, Ward E, Livermore DM. First isolation of CTX-M-3 β -lactamase producer in the United Kingdom. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:625-7.

Antibiotic resistance of coliform bacteria from community-acquired urinary tract infections in the Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina

Selma Uzunović-Kamberović¹, Mersiha Odobašić², Azra Husković², Aida Hutinović³, Nermin Ibranović³

¹ Cantonal Public Health Institute Zenica, Department for Laboratory Diagnostics, Laboratory for Clinical and Sanitary Microbiology,

²Cantonal Hospital Zenica, ³ Student, Faculty of Health, Univeristy of Zenica; Zenica, Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

Aim To collect routine susceptibility data for coliform organisms isolated from patients with community-acquired urinary tract infections (CAUTIs) in Zenica-Doboj Canton during 2004, with a view to guiding empiric therapy.

Methods Consecutive urine samples were analyzed by standard procedures. Antimicrobial susceptibility testing to fifteen antimicrobials was performed by disc-diffusion method according to causative agents (*E. coli*/non *E. coli*), age (0-6, 7-14, 15-19, 20-64, ≥65) and gender of patients.

Results *E. coli* and other coliforms (non-*E. coli*) were isolated from 2473 (11%) out of 22,451 urine samples submitted, 1,618 (65.4%) and 856 (34.6%), respectively. Inclusion of non-*E. coli* significantly increased overall resistance rates in all tested antibiotics except for ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole, and it was significantly higher in males than in females in all analysed subsets ($p < 0.05$). Specific age resistance rates to nitrofurantoin was in the range of 15-63% and 2-12% in males and females, respectively. Resistance rates to ciprofloxacin in the two oldest age groups were 51% and 57% in males, and 11% i 17% in females.

Conclusions Because of significant proportion of non-*E. coli* isolates, CAUTIs represent important problem in this region. Due to high ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance rates for all analysed subsets these drugs should be left for empiric therapy, and it is highly recommended to perform urinalysis in all patients. Ciprofloxacin and nitrofurantoin should also be considered as the first-line therapy in women above 20 years of age and in children, respectively. Continuous surveillance of antibiotic resistance of CAUTIs as well as introduction of drug prescribing control is important.

Key words: *Escherichia coli*, ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, empiric therapy;

Corresponding author:

Selma Uzunović-Kamberović
Cantonal Public Health Institute Zenica,
Department for Laboratory Diagnostics,
Laboratory for Clinical and Sanitary
Microbiology
Fra Ivana Jukića 2, 72000 Zenica,
Bosnia and Herzegovina
Phone: 00 387 32 443 580;
Fax: 00 387 32 443 530;
E-mail: selma_kamb@yahoo.com

Original submission:

28 October 2009;

Accepted:

04 December 2009.

Med Glas 2010; 7(1):40-45

INTRODUCTION

Urinary tract infections (UTIs) are the second most common infections of any organ system with 150 million infections occurring yearly worldwide (1). Increasing resistance to ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole in *Escherichia coli*, the main causative pathogen of community-acquired urinary tract infections (CAUTIs), has been reported (2-7). Instead, fluoroquinolones have been prescribed more frequently for the treatment of such infections which has been followed by an increase in fluoroquinolone-resistant *E. coli* infections, which are difficult to treat (3,4,7).

According to the recommendations of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), there is a need for current information on local susceptibility percentages, as well as knowledge of current bacterial susceptibility data and trends are important when making optimal empirical choices (8). The results of antimicrobial susceptibility of coliforms causing CAUTIs in Zenica-Doboj Canton in the period 1998-2001 have shown exceptionally high prevalence of resistance to ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole (9). Moreover, emergence of isolates producing extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in this region demonstrates quinolone resistance too (10) limiting treatment of these infections.

Using the results of routine diagnostic and susceptibility analyses, the aim of this retrospective study was to investigate antimicrobial resistance and occurrence of the coliform community-acquired UTI pathogens in Zenica-Doboj Canton in the course of 2004 in relation to age, gender, identified microorganisms, and to propose appropriate empiric therapy.

MATERIALS AND METHODS

The Laboratory for sanitary and clinical microbiology of the Cantonal Public Health Institute in Zenica covers a population of 331,229 in the Zenica-Doboj Canton (112,471 males and 218,758 females). All consecutive urine samples submitted to the Laboratory during 2004 were analyzed. It was not known whether the submitted urine samples came from patients with symptomatic upper or lower UTI or from patients with asymptomatic bacteriuria, or whether UTI was compli-

cated or uncomplicated. All urinary specimens with significant bacteriuria ($\geq 10^5$ cfu / mL urine) were further processed. *E. coli* and other coliform microorganisms were identified according to standard biochemical tests, which identified most coliforms isolated to genus level and many to species (11).

The disc diffusion method using Mueller-Hinton agar (Oxoid, Besingstoke, UK) was used to test fifteen antimicrobials (Oxoid). The applied susceptibility criteria were according to CLSI (12). *Escherichia coli* control strain ATCC 25922 was used.

Name, surname, ID, address, date of birth, and gender of the patient, date of isolation, specimen number, organism isolated and susceptibility results of positive UTI isolates were recorded as well as the number of urine specimens submitted during the study. The isolation of the same organism with the same susceptibility pattern from the same patient in the two months period was considered as duplicate and was not calculated. A few subsets in the group of coliform isolates were calculated: *E. coli* / non-*E. coli* isolates, male/female, and age groups (0-6, 7-14, 15-19, 20-64, >65 years).

The significance of differences in resistance according the all analyzed subsets was determined by means of the χ^2 test for independence. A statistically significant difference was defined as a p value of <0.05, and 95% confidence interval was used.

RESULTS

During 2004 a total number of 22,451 consecutive urine samples were analyzed. The data of susceptibility results were obtained for 2,473 (11%) (non-duplicate) coliform UTI isolates. *E. coli* was isolated in 1,418 (65.4%), non-*E. coli* isolated in 855 (34.6.8%) urine samples. *E. coli*/non-*E. coli* ratio for males and females was 35.2/74.4% and 64.7/25.6%, respectively (p<0.001) (Table 1).

Male/female distribution of coliform UTI isolates was 23.0%/77.0%, resulting in incidence values of 5.1 and 8.7 /1000/year, respectively (Table 2). Most isolates were obtained from patients over the age of 20 years, 71.1% of males and 77.3% of females.

Table 1. Distribution of causative agents of urinary tract infections in male/female population in Zenica-Doboj Canton during 2004

Causative agent	No of male/female patients with urinary tract infection according to age					Total
	0-6	7-14	15-19	20-64	≥65	
<i>Escherichia coli</i>	85/214	5/41	2/42	58/667	50/454	200/1418
non- <i>E. coli</i>	65/121	8/6	1/8	152/246	145/106	368/487
<i>Klebsiella</i> spp.	49/81	3/5	1/6	84/173	98/76	235/341
<i>Enterobacter</i> spp.	0/0	3/0	0/0	26/0	19/0	48/0
<i>Citrobacter</i> spp.	5/13	1/0	0/1	7/14	8/12	21/40
<i>Proteus</i> spp.	9/27	1/1	0/1	34/59	20/18	64/106
Total	148/335	13/47	3/50	209/913	195/560	568/1905

Overall resistance rates for all tested antibiotics was significantly higher in the isolates from male population than from female population ($p < 0.001$) except for imipenem and trimethoprim/sulfamethoxazole in which these values were lower in the male population ($p > 0.05$). Ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole displayed highest resistance rates in both groups as compared to other antibiotics, 81.2% and 47.2% in males, and 71.4% and 56.1% in females, respectively.

Inclusion of non-*E. coli* isolates (25.8%) in the analysis significantly ($p < 0.001$) influences the resistance rates against all antibiotics in all analysed subsets except to ampicillin and imipenem in females and ciprofloxacin in males. Both ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole have displayed exceptionally high resistance rates in all age groups of both, male and in female patients (up to 95.0% and 87.1%, and 60.0% and 76%, respectively). The highest resistance rates to extended-spectrum beta-lactam antibiotics were found at male patients in the age groups 20-64 and >64 years, reaching 55.0% and 57.0% for cefuroxime and cefotaxime, respectively ($p < 0.001$). The proportion of resistant isolates to all tested quinolones and nitrofurantoin was

exceptionally high in male patients, up to 68.0% and 63.0%, respectively, but in females it was up to 20.0% and 12.0% respectively, in the two oldest age groups.

DISCUSSION

This study examined antimicrobial susceptibility of the community-acquired urinary tract infections (CAUTIs) as related to etiologic agents (*E. coli*/ non-*E. coli* coliforms), gender and age.

According to some reports where the number of positive urine samples reached 53.6%, urine samples in many cases are sent for microbiological analyses after empirical treatment failure, recurrent or relapsing infection which might overestimate resistance rates (2,6,7,13). No evidence was found that practices with high resistance rates were more selective in submitting urine samples to the laboratory (14). The study has found a low number of positive samples (11.5%) and it has to be pointed out that no selection was done prior to sending urine samples (9). Still, as with all the laboratory-based surveys, possible bias due to obtaining urine samples for laboratory analyses could not be excluded which might influence the susceptibility obtained data, as previously stated (15).

Table 2. Antimicrobial resistance of coliform urinary tract infection isolates during 2004 according to age and gender

Age	No of isolates male/female	Percentage of resistance to antimicrobial agents*														
		AMP	AMC	CEF	CXM	CTX	IMP	ATM	GEN	NAL	NOR	OFX	CIP	STX	CHL	NIT
0 - 6	148/335	82/81	27/27	29/19	13/8	7/1.6	3/0	13/8	13/15	16/8	5/30	1.4/3	6/4	41/76	15/18	15/7
7 - 14	13/47	77/87	36/11	27/8.8	38/6.5	18/5	0/0	0/0	23/11	38/6	8/4.2	8/6.3	0/4.4	60/59	33/13	38/8.6
15-19	3/50	66/55	33/7.8	33/4.5	0/2	0/2	0/4.3	0/1.9	0/0	0/1.9	0/0	0/0	0/0	0/30.5	0/4.1	0/2
20-64	209/913	86/68	52/25	61/14.6	55/8.2	26/4.2	1.3/1	23/8	46/15	64/18	48/12	57/13	51/11	66/45	57/12	51/12
>65	195/560	95/66	68/21	69/10.9	57/5.1	27/1.9	1/0.9	42/4.9	61/7.1	73/22	67/20	68/20	57/17	69/50	67/11	63/7.9
Total coliform	568/1905	81.2/71.4	43.2/18.4	43.8/9	32.6/5.6	15.6/3.8	1/1.2	15.6/4.6	28.6/9.6	38.2/11.2	25.6/13.2	26.9/8.5	22.8/7.3	47.2/56.1	34.4/11.6	33.4/7.5
Total <i>E. coli</i>	200/1418	71.5/73.4	29/15.4	16.5/4.7	8.5/2.6	4/0.8	0/1.3	4.5/3.6	14.5/4.9	29/9.6	21.5/6	14.5/6.1	22/5.8	36.5/50	25/10.2	17.5/2
Total non- <i>E. coli</i>	368/487	88.8/84.4	32.5/31.6	42.9/37.3	34.5/12.7	31.1/7	1.5/1.5	25.8/5.3	34.8/20.3	61.1/20	80.5/16	87.6/15.5	33/15	32.9/43.2	32.1/23.4	52.4/26

*AMP, ampicillin; AMC, amoksicillin+klavulanska kiselina; CEF, cefalotin; CXM, cefuroksim; CTX, cefotaksim; IMP, imipenem; AZT, aztreonam; GEN, gentamicin; NAL, nalidiksična kiselina; NOR, norfloksacin; OFX, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin; STX, sulfometoksazol-trimetoprim; CHL, hloramfenikol; NIT, nitrofurantoin.

Although this laboratory-based study did not provide the data about the presence and nature of symptoms and whether infection was complicated or not, the age, gender and identified microorganisms might provide necessary information needed for selection of empirical therapy (16).

E. coli was isolated from 74.4% of the urine samples from females, but in only 35.2% of those from males. Corresponding rates for coliforms other than *E. coli* were 25.6% and 64.8%, respectively. Such a distribution of coliform CAUTI pathogens was observed only in a few reports from Southern part of Europe (17), Latin America (18), and Britain (19), and in previous report from this region, but not in other countries (3). According to postulate stated previously, the distribution of CAUTI pathogens in this region with significant proportion of non-*E. coli* coliforms (34.6%), namely *Klebsiella* spp. (23.3%), which comprised secondary pathogenic species, corresponded to the distribution that occurred in hospital settings, or complicated CAUTIs (3,20). Therefore, it is evident that the number of complicated UTIs in this report was probably large.

The higher resistance rate to all the tested agents in males than in females observed in this study is a usual finding and it probably reflects the complicated nature of UTI in man (2,18,20,21). Complicated UTI, including male gender, urinary tract abnormalities, urinary catheterization and older age were found to be associated with high ciprofloxacin resistance rates (4,21).

Ampicillin- and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance rates in this report were far higher in comparison other reports (19,21). Empirical therapy with ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole in our region seems inadequate even for some usual population category, and should be avoided. In some regions trimethoprim/sulfamethoxazole also showed such high frequencies of resistance (2,4,5), but in most European countries it is still useful (3,17). According to our results ciprofloxacin resistance has shown high value in two oldest age groups of male patients and should be avoided for empirical therapy, but it is still useful in females. Nitrofurantoin has shown a low resistance rate in the age groups 0-6 and 7-14 years of female patients and in the age group 0-6 of males, and should be considered as the first-line therapy in this region (4).

According to previously given suggestion about a cut-off point of 20% as the level of resistance at which an agent should no longer be used empirically (22), it is highly recommended to perform urinalysis and antibiotic susceptibility testing in all patients in this region, except in the age group 0-6 years of both male and female patients in which nitrofurantoin can be applied, and in the age groups 20-64 and ≥ 65 years of female patients, in which ciprofloxacin can be applied.

The steady increase in resistance of uropathogenic *E. coli* to co-trimoxazol, ampicillin and fluoroquinolones emphasizes the need for an alternative, effective oral compound for the treatment of UTIs. It seems that fosfomycin tromethamine could replace these drugs as well as nitrofurantoin because of low level of resistance (0.5%) (23) and less side-effects, respectively (24).

Our results suggest a decrease in the resistance to ampicillin, co-amoxiclav, all cephalosporines, gentamicin and chloramphenicol for both males and females in 2004 as compared to 2001 in the range 0.4-22.7%. On the other hand, resistance to cotrimoxazole, norfloxacin and ciprofloxacin has decreased in males (15.1%, 3.8% and 1.6%, respectively), but increased in females (9.3%, 7.4% and 3%, respectively) in the same period (9). Moreover, it was previously reported about high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing (ESBL) coliforms in CAUTIs in this region in 2004 (3.5%) even in children below 6 years of age (3.8%) (10). Also, higher prevalence of ESBL-producing strains among *K. pneumonia* than among *E. coli* (7.8% v.s. 0.7%) was noted including predominance of SHV-type ESBL among community isolates (25). As it was previously stated, exposure to second- and third-generation cephalosporins is an important risk factor for the occurrence of ESBL bacteria (26,27), it is very important to introduce active surveillance of antibiotic usage in this region in order to limit misuse and overuse of antimicrobial drugs.

It is likely that an intensive usage of ampicillin, cotrimoxazole and ciprofloxacin (fluoroquinolones) might have contributed to their high resistance rates, although the reports about relationship between usage and resistance are controversial. (5,19,28,29). Sometimes it was not possible to demonstrate this relationship for some

antibiotics such as ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole, but for others such as ciprofloxacin, a statistically significant relationship was established, and it could be concluded that relationship between usage and resistance has multi-factorial origin (the age profile of the population, social deprivation, locality and the use of antibiotics in veterinary and agricultural practice (28-30). The ease of procuring antibiotics without a prescription in this region could result in inordinate and irrational use of antibiotics.

To optimise the use of empiric antibacterial therapy for UTI, physicians should know the etiology and susceptibility patterns of UTI pathogens in their population as well as clinical and epidemiological data of the patients.

REFERENCES

1. Stamm WE. An epidemic of urinary tract infections? *New Engl J Med* 2001; 345: 1055-7.
2. Bean DC, Krahe D, Wareham DW. Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates, London 2005-2006. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7:13.
3. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Negri R, Manca N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: Etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. *Med Sci Monit* 2007; 13:BR136-44.
4. Arslan H, Azap ÖK, Ergönül Ö, Timurkayanak F, on behalf of the Urinary Tract Infection Study Group. *J Antimicrob Chemother* 2005; 9:14-8.
5. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Alighrah, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 6:4.
6. Guidoni EB, Berezin EN, Nigro S, Santiago NA, Benini V, Toporovski J. Antibiotic resistance patterns of pediatric community acquired urinary tract infections. *Braz J Infect Dis* 2008; 12:321-3.
7. Oteo J, Aracil B, Hoyo JF, Perianes J, Gómez-Garcés JL, Alós JI. Do the quinolones still constitute valid empirical therapy for community-acquired urinary tract infections in Spain. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5:654-6.
8. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* 1999; 29:745-58.
9. Uzunovic-Kamberovic S. Antibiotic resistance of coliform organisms from community acquired urinary tract infections in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:344-8.
10. Uzunovic-Kamberovic S, Saric D, Sestic S. Community-acquired urinary tract infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *Med Glas* 2006; 3: 46-52
11. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJ. Enterobacteriaceae. In: Balows A, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH, Murray PR, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington D. C.: ASM Press, 1995.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA: CLSI, 2005.
13. Grude N, Tveten Y, Kristiansen B-E. Urinary tract infections in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:543-7.
14. Magee JT, Pritchard EL, Fitzgerald KA, Dunstan FD, Howard AJ. Antibiotic prescribing and antibiotic resistance in community practice: retrospective study, 1996-8. *Br Me J* 1998; 319:1239-40.
15. Ti TY, Kumarasinghe G, Taylor MB, Tan SL, Ee A, Chua C, Low A. What is true community-acquired infection? Comparison of pathogens identified in urine samples from routine outpatients specimens and from community clinics in a prospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:242-5.
16. Howard AJ, Magee JT, Fitzgerald KA, Dunstan FD; Welsh Antibiotic Study Group. Factors associated with antibiotic resistance in coliform organisms from community urinary tract infections in Wales. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:305-313.
17. Kahlmeter G. The ECO*SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens-interim report. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 Suppl A: 15-22.

ACKNOWLEDGMENT/DISCLOSURE

This study was presented as part of: Mersiha Odošajić, Aida Hutinović, Nermin Ibranović, Azra Husković, Selma Uzunović-Kamberović. Antibiotic resistance of coliform organisms from community-acquired urinary tract infections in the Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. Second Congress of Hospital Infection Control of Bosnia and Herzegovina with international participation, Tuzla, B&H, 04. – 07. 11. 09. Microbiology Society of B&H, Tuzla, B&H, 2009., pp. 55-56.

Transparency declaration: None to declare

18. Gales AC, Jones RN, Gordon KA, Sader HS, Wilke WW, Beach ML, Pfaller MA, Doern GV. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:295-303.
19. Barrett SP, Savage MA, Rebec MP *et al*. Antibiotic sensitivity of bacteria associated with community-acquired urinary tract infections in Britain. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:359-65.
20. Tabibian JH, Gornbein J, Heidari A, Dien SL, Lau VH, Chahal P, Churchill BM, Haake DA. Uropathogens and host characteristics. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3980-6.
21. Alós JI, Serrano M-G, Gómez-Garcés JL *et al*. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:199-203.
22. Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001; 135:41-50.
23. Kahlmeter G. An International survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:69-76.
24. Knottnerus BJ, Nys S, ter Reijt G, Donker G, Geerlings SE, Stobberingh E. Fosfomicin tromethamine as second agent for the treatment of acute, uncomplicated urinary tract infections in adult female patients in The Netherlands? *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:356-9.
25. Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, Vranes J. Prevalence of SHV-5 β -lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:820-23.
26. Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gómez L, Garcia Vidal C, Quintana S, Vila J, Garau J. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:780-3.
27. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.
28. Kahlmeter G, Munday P. Cross-resistance and associated resistance in 2478 *Escherichia coli* isolates from Pan-European ECO-SENS Project surveying the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:128-31.
29. Hillier SL, Magee JT, Howard AJ, Palmer SR. How strong is the evidence that antibiotic use is a risk factor for antibiotic-resistant, community-acquired urinary tract infection? *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:241-7.
30. Uzunovic-Kamberovic S. Some epidemiologic features of *Campylobacter jejuni/coli* infections in Bosnia and Herzegovina after the war. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:458-60.

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

Tatjana Marijan¹, Vanda Plečko², Jasmina Vraneš¹, Ana Mlinarić Džepina¹, Branka Bedenić², Smilja Kalenić²

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

SAŽETAK

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

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

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

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

Cljučne riječi: infekcije mokraćnog sustava, konjugacija, kotransfer rezistencije.

Corresponding author:

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

Originalna prijava:

13. oktobar 2009.;

Korigirana verzija:

14. decembar 2009.;

Prihvaćeno:

18. decembar 2009.

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

UVOD

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

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

MATERIJAL I METODE

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

cije, te provedena molekularna karakterizacija izoliranih beta-laktamaza.

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

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

Lančana reakcija polimeraze izvedena je na izolatima pacijenata (sojevi donori), te na njihovim transkonjugantima (12). Ukratko, izolacija nukleinske kiseline sojeva izvedena je kuhanjem sojeva 10 min. na 95°C, u sterilnoj destiliranoj vodi. 5 µl tako pripremljenog uzorka dodano je u 45 µl reakcijske smjese (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, SAD) koja je sadržavala: 18 µl sterilne destilirane vode, 25 µl PCR master mixa (25 U Taq DNA polimeraze u 20 mM Tris-HCL, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, Brij 35, 0,01%(v/v), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP-svaki 0,4 mM)) i 1 µl svakog primera. Za detekciju TEM β-laktamaza korišteni su primeri: OT-3 (TIB MOLBIOL) 5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG i OT-4 (TIB MOLBIOL) 5'- CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG. Za detekciju SHV β-laktamaza korišteni su primeri: SHV-F (TIB MOLBIOL) 5'- GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC i SHV-R (TIB MOLBIOL) 5'- TC-TTTCGATGCCGCCGCCAGTCA. Za detekciju CTX-M β-laktamaza korišteni su primeri: MA-1

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

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

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

UV transiluminatoru nakon bojenja etidijum bromidom.

Statistička obrada rezultata izvedena je χ -kvadratom i Fisherovim egzaktim testom. Statistički značajnom smatrana je p-vrijednost <0,01.

REZULTATI

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

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

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

Oznaka soja	Minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) na različite antibiotike*													
	AMX	CN	CXM	CAZ	CTX	FEP	FOX	IPM	AMC	TZP	GM	NET	AN	CIP
1	>128	64	32	32	8	2	4	1	4	2	32	16	64	<0,008
2	>128	64	32	128	1	4	8	0,125	4	2	64	8	1	16
3	>128	64	32	32	8	1	4	0,125	4	2	32	8	64	<0,008
4	>128	128	16	128	8	1	4	0,125	4	1	32	8	64	<0,008
5	>128	>128	32	32	8	1	2	0,125	4	1	16	8	64	<0,008
6	>128	>128	16	32	8	1	4	0,125	4	1	32	16	64	<0,008
7	>128	64	16	64	16	2	8	0,125	4	2	0,5	0,25	1	0,125
8	>128	64	16	32	8	2	4	0,125	4	1	32	16	64	<0,008
9	>128	>128	>128	>128	64	16	8	0,125	4	2	16	8	64	<0,008
10	>128	64	16	64	16	4	4	0,25	4	2	16	8	64	0,016
11	>128	>128	128	>128	64	32	8	0,125	4	2	64	64	64	0,016
12	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	0,125	8	>256	32	64	64	0,008
13	>128	64	32	128	16	4	4	0,125	4	1	64	64	64	<0,008
14	>128	64	32	32	64	8	2	0,125	16	64	64	32	64	<0,008
15	>128	64	32	>128	16	2	4	0,125	4	1	32	16	64	<0,008
16	>128	>128	64	128	16	8	4	0,25	4	2	4	0,5	2	<0,008
17	>128	128	128	>128	32	8	4	0,125	4	2	0,5	0,5	1	<0,008
18	>128	64	16	128	32	2	4	0,125	4	1	32	8	64	0,008
19	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	0,25	16	2	1	0,5	8	1
20	>128	64	32	64	16	2	4	0,25	4	1	0,5	0,25	1	32
21	>128	64	64	128	32	1	8	0,125	4	2	64	16	64	<0,008
22	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	0,25	8	2	1	0,5	4	0,125
23	>128	>128	>128	>128	>128	64	8	0,125	16	64	64	16	64	<0,008
24	>128	128	128	128	128	1	4	0,06	4	2	64	16	64	<0,008
25	>128	128	64	16	16	2	4	0,125	4	1	64	8	64	<0,008
26	>128	64	64	32	32	8	4	0,25	16	64	0,5	2	8	<0,008
27	>128	>128	128	64	64	16	4	0,125	4	2	64	16	64	<0,008
28	>128	128	64	128	64	8	4	0,25	4	1	0,5	2	8	<0,008
29	>128	64	64	64	64	4	8	0,125	4	2	128	8	64	<0,008
30	>128	>128	64	>128	128	8	8	0,125	4	4	64	16	32	0,016
31	>128	128	128	64	128	128	4	0,25	16	256	128	32	64	<0,008
32	>128	64	16	64	32	2	8	0,25	4	2	32	8	64	<0,008
33	>128	>128	128	>128	128	8	4	0,125	4	1	>128	16	64	<0,008
34	>128	>128	>128	2	>128	>128	8	0,5	4	1	2	4	128	0,25
35	>128	128	8	>128	64	1	4	0,125	4	2	128	8	64	<0,008
36	>128	16	16	16	64	1	4	0,125	4	1	64	16	64	<0,008
37	>128	>128	64	>128	>128	16	4	0,125	4	2	>128	8	64	<0,008
38	>128	64	32	128	16	2	8	0,125	4	2	32	8	64	0,016
39	>128	32	16	8	4	1	2	0,125	8	16	32	32	64	<0,008
40	>128	16	8	16	16	1	2	0,25	16	16	32	16	64	<0,008
41	>128	32	64	128	32	2	2	0,125	4	1	32	16	64	<0,008
42	>128	32	16	32	32	1	2	0,125	8	2	32	16	64	<0,008
43	>128	128	64	>128	32	4	4	0,25	2	2	32	16	64	<0,008
44	>128	32	8	32	8	2	4	0,125	2	2	32	8	64	0,016
45	>128	>128	128	>128	32	8	2	0,125	4	2	0,5	0,25	2	<0,008
46	>128	32	64	128	16	0,5	4	0,125	4	2	32	16	64	0,016
47	>128	64	32	64	16	2	4	0,25	4	2	16	32	64	<0,008
48	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	0,5	16	64	64	32	8	128

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

1. Borer A, Gilad J, Menashe G, Peled N, Riesenber K, Schlaeffer F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in Southern Israel. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR44-CR47.
2. Daza R, Gutierrez J, Piedrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18:211-5.
3. Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended-spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. *Pharmacotherapy* 2002; 22:14-20.
4. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. *J Chemother* 1998; 10:449-59.
5. Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V and the Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:14-8.
6. Tonkić M, Goić Barišić I, Punda-Polić V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Int Microbiol* 2005; 8:119-24.
7. Tambić T, Tambić A, Kalenić S, Gilić V, Krakar B, Payerl-Pal M, Petanović M, Punda-Polić V, Radolović L, Ritterman I, Sokal A, Šterk-Kuzmanović N, Tkalec N, Vuković D. Monitoring bacterial resistance to antibiotics in the Croatian Republic. *Liječ Vjesn* 2000; 122:160-4.
8. Akademija Medicinskih Znanosti Hrvatske, Rezistencija bakterija na antibiotike u RH, Izvještaji; <http://www.amzh.hr/cro/index-cro.htm>
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S13 (M2). NCCLS, Wayne, Pennsylvania USA, 2003.
10. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
11. Philippon AM, Paul GC, Jacoby GA. Properties of PSE-2 beta-lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:362-9.
12. Bedenić B. Biokemijska tipizacija beta-laktamaza proširenog spektra u kliničkim izolatima *Klebsiella pneumoniae*. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1998.
13. Pitout JDD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38:36-1741.
14. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.
15. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, Perez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1089-94.
16. Krawczyk B, Samet A, Czarniak E, Szczapa J, Kur J. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: control of an outbreak using a new ADSRRS technique. *Pol J Microbiol* 2005; 54:105-10.
17. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, Villari P, Zarrilli R. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:979-82.
18. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995; 21:915-23.
19. Pitout JDD, Thompson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Coudron P, Sanders CC. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:596-600.
20. Essack SY. Treatment options for extended-spectrum β -lactamase-producers. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190:181-4.
21. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, Schwaber MJ, Carmeli Y. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1150-6.
22. Franciczek R, Krzyzanowska B, Dolna I, Mokracka G, Szufnarowski K. Extended-spectrum beta-lactamase-conferring transferable resistance to different antimicrobial agents in *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50:119-24.
23. Franciczek R, Dolna I, Krzyzanowska B, Szufnarowski K, Kowalska-Krochmal B, Zielinska M. Conjugative transfer frequency of resistance genes from ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from patients hospitalized in pediatric wards. *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58:41-51.
24. Marijan T, Mlinarić-Džepina A, Vraneš J, Leskovar V, Knežević J, Matica B. Odlike infekcija mokraćnog sustava kod starijih izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije. *Med Glas* 2007; 4:8-13.
25. Colodner R, Samra Z, Keller N, Sprecher H, Block C, Peled N, Lazarovitch T, Bardenstein R, Schwartz-Harari O, Carmeli Y; the Israel ESBL Group. First national surveillance of susceptibility of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to antimicrobials in Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:201-5.
26. Liao CH, Sheng WH, Wang JT, Sun HY, Wang HK, Hsueh PR, Chen YC, Chang SC. In vitro activities of 16 antimicrobial agents against clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in two regional hospitals in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39:59-66.
27. Arslan H, Azap ÖK, Ergönül Ö, Timurkaynak F on behalf of the Urinary Tract Infection Study Group. Risk

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

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

Tatjana Marijan¹, Vanda Plečko², Jasmina Vraneš¹, Ana Mlinarić Džepina¹, Branka Bedenić², Smilja Kalenić²

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

Rezistencija uropatogenih sojeva bakterije *Escherichia coli* kod trudnica i žena generativne dobi u usporedbi s potrošnjom antibiotika u Zagrebu

Josip Čulig^{1,2}, Ana Mlinarić-Džepina³, Marcel Leppée¹, Jasmina Vraneš^{3,4}

¹Referentni centar za farmakoepidemiologiju, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb; ²Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek; ³Služba za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb; ⁴Katedra za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb; Hrvatska

SAŽETAK

Cilj: Usporedba rezistencije uropatogenih sojeva *Escherichia coli* (UPEC) na antibiotike, izoliranih u žena generativne dobi i trudnica, u dvogodišnjem razdoblju (2004. i 2008.) u Zagrebu te usporedba rezistencije i potrošnje antibiotika.

Metode: Ispitivanje osjetljivosti na 16 antibiotika provedeno je standardnom disk difuzijskom metodom. Pomoću prikupljenih podataka o potrošnji antibiotika izračunate su definirane dnevne doze (DDD) i DDD na 1.000 stanovnika pomoću Anatomsko-terapijsko-kemijske (ATK)/DDD metodologije. Podaci o potrošnji antibiotika u trudnoći prikupljeni su anketiranjem 893 žene nakon poroda.

Rezultati: Tijekom 2004. godine rezistencija UPEC-a utvrđena kod trudnica nije se razlikovala od rezistencije utvrđene kod žena generativne dobi koje nisu bile trudne, osim za amoksicilin i nitrofurantoin gdje je utvrđena statistički značajno viša rezistencija kod trudnica ($p < 0,01$). Četiri godine kasnije opažena je statistički značajno češća rezistencija samo na norfloksacin kod žena koje nisu bile trudne ($p < 0,01$). Uspoređujući rezistenciju u 2004. i 2008. godini, kod svih žena je zapaženo statistički značajno smanjenje rezistencije na cefaleksin i nitrofurantoin ($p < 0,01$). Izvanbolnička potrošnja antimikrobnih lijekova u Zagrebu značajno je porasla od 32 na 39 DDD/1.000 stanovnika na dan. Najviše upotrebljavani antibiotik bio je koamosiklav, a njegova potrošnja porasla je od 9,6 na 12,2 DDD/1.000/dan. Amoksicilin ili koamoksiklav upotrebljavalo je čak 9,6% anketiranih žena tijekom trudnoće.

Zaključak: Zbog opaženog značajnog pada rezistencije, cefaleksin je lijek izbora u liječenju infekcija mokraćnog sustava žena generativne dobi te se, uz koamoksiklav, može davati u trudnoći. Potrebno je i daljnje praćenje rezistencije uzročnika urinarnih infekcija kod trudnica, što osigurava učinkovitost empirijske terapije čije su varijacije sužene zbog potencijalno štetnog učinka antibiotika na plod.

Ključne riječi: infekcije mokraćnog sustava, potrošnja lijekova, trudnoća

Corresponding author:

Marcel Leppée,
Zavod za javno zdravstvo
„Dr. Andrija Štampar“,
Centar za farmakoepidemiologiju,
Mirogojska 16, 10000 Zagreb, Hrvatska
Phone: +385 1 469 6166,
Fax: +385 1 467 8013
E-mail: marcel.leppee@stampar.hr

Originalna prijava:

29. septembar 2009.;

Korigirana verzija:

12. decembar 2009.;

Prihvaćeno:

18. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):54-59

UVOD

Jedna od najčešćih lokalizacija infekcija kod ljudi jest mokraćni sustav, pa je to jedna od čestih indikacija za primjenu antimikrobne terapije. Naravno, to su im sklone žene kod kojih su, zbog kratkoće mokraćne cijevi, uroinfekcije prosječno tri puta češće nego kod muškaraca (1). *Escherichia coli* je uzročnik 80% nekomplikiranih infekcija mokraćnog sustava, a neki sojevi mogu pokazati otpornost, koja je u porastu kao posljedica široke i često neadekvatne primjene antibiotika (2). Učestalost rezistencije na antibiotike je u korelaciji s njihovom upotrebom. Bakterije imaju razvijene mehanizme genetske prilagodbe i posljedica uporabe antibiotika jeste uvijek brži ili sporiji razvoj rezistencije (3, 4). Zbog porasta rezistencije bakterija na antibiotike neophodno je stalno praćenje i poznavanje stope rezistencije za pojedine patogene u vlastitoj sredini. Ukoliko je rezistencija na određeni antibiotik viša od 20%, taj antibiotik ne treba propisivati u empirijskom antimikrobnom liječenju.

U trudnoći su česte uroinfekcije koje zahtijevaju određenu terapiju. Pojava infekcije kod trudnice može ugroziti i majku i plod, pa se u trudnica liječi i asimptomatska bakteriurija. Uz to, postoji mogućnost da tijekom porođaja dođe i do intrauterine fetalne infekcije zbog rupture fetalnih membrana, koje su jedan od važnih uzroka perinatalne smrtnosti i poroda (5-7). Liječenje infekcija u trudnoći, puerperiju i laktaciji, razlikuje se od liječenja izvan trudnoće, između ostaloga i zbog toga što se mora voditi računa o zdravlju fetusa/djeteta i majke (8).

Svi antimikrobni lijekovi prolaze kroz placentnu membranu u manjoj ili većoj mjeri te stoga svaka primjena antimikrobnog lijeka znači izravno izlaganje djeteta mogućim štetnim učincima. Danas se kao sigurni u trudnoći smatraju penicilini (kategorija B prema FDA - Food and Drug Administration), cefalosporini (B) i makrolidi (osim klaritromicina koji je označen s C).

Cilj ovoga rada bio je utvrditi postoje li razlike u rezistenciji *E. coli* na antimikrobne lijekove ovisno o tome je li soj izoliran u trudnice ili u žene generativne dobi koja nije trudna te usporediti rezistenciju s potrošnjom antibiotika u promatranom razdoblju te potrošnjom antibiotika u trudnoći.

MATERIJAL I METODE

U Laboratoriju za urogenitalne infekcije Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, obrađivani su uzorci mokraće izvanbolničkih pacijenata s područja grada Zagreba. Uspoređena je rezistencija UPEC-a utvrđena tijekom 2004. i 2008. godine. Antimikrobna osjetljivost ispitivana je na 16 antibiotika standardnom metodom disk difuzije, pomoću antibiotskih diskova (BIO-RAD, Marnes-la Coquette, Francuska).

Izvanbolnička potrošnja antibiotika prikazana je pomoću dnevnih definiranih doza na 1.000 stanovnika na dan (DDD/1.000/dan). Pomoću prikupljenih podataka iz zagrebačkih ljekarni o potrošnji za svaki antibiotik registriran u Hrvatskoj, izračunate su definirane dnevne doze (DDD) i DDD na 1.000 stanovnika upotrebom Anatomsko-terapijsko-kemijske (ATK) klasifikacije lijekova i definiranih dnevnih doza, odnosno ATK/DDD metodologije Svjetske zdravstvene organizacije (9).

Istraživanje o korištenju antibiotika u trudnoći provedeno je u razdoblju od mjesec dana (svibanj 2004. godine) u sva četiri zagrebačka rodilišta, a obuhvaćeno je 893 roditelja od ukupno 11.430 u 2004. godini. Provedeno je putem jednostavno strukturiranog standardiziranog upitnika, koji se sastojao od dva dijela - intervju majke i bolničkih podataka. Rodilje je, u prvom tjednu nakon poroda, intervjuirao bolnički liječnik ginekolog zajedno s liječnikom specijalistom javnog zdravstva.

REZULTATI

U analizi dviju godina (2004. i 2008.) bio je uključen gotovo jednak broj izolata (n=17.447, 2004.; n=17.906, 2008.). Nešto veći broj rezistentnih izolata evidentiran je u 2004. godini, s tim da je odnos rezistentnih izolata između trudnica i ostalih žena u dobi 15-50 godina, gotovo jednak u obje istraživane godine.

Tablica 1. prikazuje senzitivne i rezistentne izolate kod trudnica i ostalih žena na pojedine antimikrobne lijekove u 2004. i 2008. godini. Na vodećem mjestu među antimikrobnim lijekovima na koje bakterije *E. coli* pokazuju rezistenciju nalazi se amoksicilin (ukupno 1.614 rezistentnih izolata), zatim slijede sulfametoksazol + trimetoprim (792), cefaleksin (577), gentamicin (150), nitro-

Tablica 1. Rezistentni izolati u trudnica i ostalih žena na pojedine antibiotike u 2004. i 2008. godini

Antibiotik	2004.				2008.			
	Trudnice (n=313)		Ostale (n=1853)		Trudnice (n=261)		Ostale (n=1606)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Amoksicilin	144	46,0	705	38,0	105	40,2	660	41,1
Amoksicilin + klavulanska kis.	9	2,9	37	2,0	2	0,8	26	1,6
Cefaleksin	68	21,7	345	18,6	22	8,4	142	8,8
Cefuroksim	6	1,9	26	1,4	2	0,8	26	1,6
Ceftibuten	6	1,9	21	1,1	-	-	-	-
Cefiksini	-	-	-	-	2	0,8	26	1,6
Gentamicin	16	5,1	66	3,6	10	3,8	58	3,6
Sulfametoksazol + trimetoprim	67	21,4	366	19,8	55	21,1	304	18,9
Nitrofurantoin	25	8,0	90	4,9	2	0,8	13	0,8
Norfloksacin	-	-	75	4,0	2	0,8	78	4,9

furantoin (130), norfloksacin (80), amoksicilin + klavulanska kiselina (74), cefuroksim (60), cefiksini (28) i ceftibuten (27).

Tijekom 2004. rezistencija *E. coli*, utvrđena kod trudnica, nije se razlikovala od rezistencije utvrđene u žena generativne dobi koje nisu bile trudne, na pojedine antimikrobne lijekove, osim za amoksicilin i nitrofurantoin gdje je utvrđena statistički značajno viša rezistencija kod trudnica nego kod ostalih žena generativne dobi koje nisu bile trudne ($\chi^2=6,79$; $p<0,01$, odnosno $\chi^2=4,61$; $p<0,01$).

Četiri godine kasnije opažena je statistički značajno češća rezistencija na norfloksacin kod žena koje nisu bile trudne ($\chi^2=8,62$; $p<0,01$), dok se rezistencija na ostale ispitivane antibiotike nije razlikovala.

Uspoređujući rezistenciju u 2004. i 2008. godini, kod trudnica je zapaženo statistički značajno smanjenje rezistencije na cefaleksin ($\chi^2=18,04$; $p<0,01$) i nitrofurantoin ($\chi^2=14,98$; $p<0,01$), a isto je zapaženo kod ostalih žena generativne dobi ($\chi^2=67,17$; $p<0,01$; odnosno $\chi^2=47,39$; $p<0,01$), dok se rezistencija na ostale ispitivane antibiotike nije statistički značajno mijenjala tijekom promatranog razdoblja.

Izvanbolnička potrošnja antimikrobnih lijekova u Zagrebu značajno je porasla u promatranom

Tablica 3. Žene (n=893) koje su koristile lijekove u trudnoći (2004. godina)

Šifra ATK	Antimikrobni lijek		Ukupno n (%)
	Naziv lijeka		
J01AA	doksiciklin		6 (0,7)
J01CA	ampicilin		10 (1,1)
	amoksicilin *		47 (5,3)
J01CE	benzilpenicilin		11 (1,2)
	benzatin fenoksimetilpenicilin		9 (1,0)
J01CF	kloksacilin		4 (0,4)
J01CR	amoksicilin+klavulanska kiselina *		38 (4,3)
J01DA	cefaleksin *		55 (6,2)
	cefazolin		5 (0,6)
J01DC	cefuroksim *		13 (1,5)
	cefuroksimaksetil *		38 (4,3)
J01DD	ceftibuten *		1 (0,1)
J01EE	sulfonamidi + trimetoprim *		2 (0,2)
J01FA	eritromicin		6 (0,7)
	azitromicin		18 (2,0)
J01GB	gentamicin *		9 (1,0)
J01MA	ciprofloksacin		4 (0,4)
	norfloksacin *		4 (0,4)
J01XD	metronidazol		5 (0,6)

* antibiotici čija je rezistencija istraživana u radu

razdoblju, od 32 na 39 DDD/1.000 stanovnika na dan (Tablica 2). Najviše upotrebljavani antibiotik bio je koamosiklav, a njegova potrošnja porasla je od 9,6 na 12,2 DDD/1.000/dan u promatranom razdoblju.

Tablica 3. pokazuje koje su antibiotike tijekom trudnoće koristile intervjuirane roditelje u 2004. godini. Ukupno, potrošnja antibiotika u ovih 893 žena bila je visoka te je 31,6% trudnica koristilo antibiotike, a najviše su korišteni ampicilin/amoksicilin (zajedno 6,4%), koamoksiklav, cefaleksin i cefuroksim (oko 5% intervjuiranih žena svaki), a 2% žena koristilo je azitromicin tijekom trudnoće, dok se zabilježena potrošnja ostalih antibiotika kretala oko 1%.

DISKUSIJA

Kombinacija amoksicilina i klavulanske kiseline već je godinama najpropisivaniji antibiotik čija je potrošnja i dalje u porastu te u Zagrebu čini gotovo trećinu izvanbolničke potrošnje antibiotika, iako bi prednost trebalo davati antibioticima uskog spektra djelovanja. Često empirijsko propisivanje antibiotika širokog spektra prijeti razvojem rezistentnosti.

Tablica 2. Izvanbolnička potrošnja pojedinih antimikrobnih lijekova (DDD/1.000/dan) u Zagrebu, u razdoblju 2004-2008. godine

ATK šifra	Antimikrobni lijek	FDA	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.
J 01 CA	Penicilini širokog spektra	B/C	4,83	4,28	3,96	3,64	3,48
J 01 CR	Kombinacije penicilina		9,63	9,61	10,15	11,21	12,22
J 01 C	Penicilini ukupno		14,81	17,99	18,55	18,56	19,72
J 01 DB	Cefalosporini I generacije	B	1,85	1,60	1,44	1,67	1,43
J 01 DC	Cefalosporini II generacije	B	2,57	2,53	5,49	5,21	6,14
J 01 D.D.	Cefalosporini III. gen.	B	0,01	0,47	0,45	0,55	0,58
J 01 d.d.	Cefalosporini III. gen.		0,01	0,12	0,16	0,01	0,00
J 01 D	Drugi beta-laktamski		5,18	4,79	7,65	7,80	8,38
J 01 E	Sulfonamidi + trimetoprim	B	2,18	1,65	1,39	1,41	1,11
J 01 XE	Derivati nitrofurana	B	0,87	0,91	0,91	0,76	0,83
J 01 MA	Fluorokinoloni	C	0,12	1,6	1,51	1,38	1,06
J 01 M	Svi kinoloni		2,28	2,16	2,16	2,15	2,02
J 01	Antibiotici ukupno		32,07	34,62	37,38	38,31	39,28

stencije mikroorganizama koja ima niz nepovoljnih posljedica, kako za bolesnike, tako i za zdravstvo u cjelini te u konačnici poskupljuje liječenje, čineći antibiotik neučinkovitim. Visoka potrošnja antibiotika u Zagrebu, pokazana u rezultatima ovog istraživanja, koja k tome pokazuje i zabrinjavajući trend stalnog rasta, povezuje se s trendom porasta rezistencije na antibiotike. Dodatno zabrinjava upotreba antibiotika u trudnoći, ne samo zbog razvitka rezistencije mikroorganizama, već i zbog mogućih neželjenih djelovanja na plod. U ovom istraživanju utvrđeno je da je 31% ispitivanih žena rabilo antibiotike u trudnoći, što je slično finskoj studiji koju su objavili Malm i sur. (10). U Mađarskoj je, također, provedena velika studija o uporabi antibiotika u trudnih žena. Bilo je obuhvaćeno 38.151 trudnica koje su rodile djecu bez kongenitalnih anomalija, a njih 17,2% su tijekom trudnoće uzimale antibiotike. Najveći broj trudnica uzimao je penicilin (14,5%) i ampicilin (6,9%). Važno je napomenuti da je cefalosporine rabilo samo 1,2% trudnica, a tetraciklin, za koji je dokazana štetnost tijekom trudnoće, 0,7% trudnica. Dokazano je da je niža porođajna težina bila značajno češća kod žena koje su tijekom trudnoće uzimale antibiotike, za razliku od trudnica koje ih nisu upotrebljavale (11). U danskoj studiji, koja je rađena na osnovi obrade recepata, antimikrobne je lijekove rabila četvrtina trudnica (12). Istraživanje Lacroix i sur. u Francuskoj, koje je obuhvatilo 1.000 žena, kazuje da su antimikrobni lijekovi propisani u više od polovice trudnica (13), što sve zajedno ilustrira činjenicu da se antibiotici ubrajaju među lijekove koji se najčešće upotrebljavaju u trudnoći. Prema studiji o korištenju lijekova u trudnoći, provedenoj 2004. godine u Zagrebu, visoku potrošnju antibiotika tijekom trudnoće činili su, u najvećoj mjeri, cefalosporini i penicilini, koji su lijekovi izbora u trudnoći (14).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je 1% žena liječeno aminoglikozidima tijekom trudnoće. Aminoglikozidi su toksični lijekovi koji kod fetusa mogu uzrokovati iste neželjene učinke kao i kod majke, pa se u trudnoći mogu rabiti samo u iznimnim situacijama, kada drugi antibiotici nisu učinkoviti ili se ne mogu primijeniti. Slično, kombinacija sulfametoksazola i trimetoprima (kategorija C) je kontraindicirana u trudnoći zbog djelovanja trimetoprima na metabolizam folata (15), a upotreba ovog antimikrobnog li-

jeka, kao i aminoglikozida, utvrđena je u ovom istraživanju.

Antibiotici se ne upotrebljavaju samo u terapiji infekcija mokraćnog sustava već, također, i u prevenciji, no, u ovom istraživanju, upotreba antibiotika prikazana je skupno, bez obzira jesu li dani u terapijske ili profilaktičke svrhe. Hrvatske nacionalne smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava navode način postupanja kod trudnica s ciljem sprečavanja pojave infekcija mokraćnog sustava (16, 17). Probir na asimptomatsku bakteriuriju ($\geq 10^5$ bakterija/mL u dvije uzastopne kulture srednjeg mlaza urina, u razmaku ≥ 24 sata) treba učiniti u prvom trimestru trudnoće, a u slučaju ranije prisutne infekcije ili asimptomatske bakteriurije, prilikom svake posjete liječniku do poroda (18, 19, 20), te se u slučaju asimptomatske bakteriurije propisuju antibiotici. Većina simptomatskih infekcija kod trudnica prezentira se kao akutni cistitis (21). Preporuča se korištenje beta-laktamskih antibiotika u trudnoći (sedam dana za cistitis, 14 dana za pijelonefritis), budući da su učinkoviti u liječenju infekcija mokraćnog sustava i sigurni za korištenje u trudnoći (21, 22, 23). Kinoloni, tetraciklini i kombinacija sulfametoksazola i trimetoprima, u trudnoći se ne smiju primjenjivati (24, 25). Nitrofurantoin se može koristiti u liječenju cistitisa i asimptomatske bakteriurije sedam dana, ali samo u prvom i drugom trimestru trudnoće (26).

S obzirom da su rezultati ovog istraživanja pokazali da je došlo do statistički značajnog smanjenja rezistencije *E. coli* na cefaleksin (s 20% na samo 8%), ovaj antibiotik može se preporučiti i za empirijsku terapiju uroinfekcija žena generativne dobi, a s obzirom na njegovu neškodljivost opravdana je i njegova upotreba u trudnoći. Potrebno je i daljnje praćenje rezistencije uzročnika urinarnih infekcija kod trudnica, što osigurava učinkovitost empirijske terapije čije su varijacije sužene zbog potencijalno štetnog učinka nekih antibiotika na plod.

ZAHVALE/IZJAVE

Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenih projekata provedenih uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske, br. 121-1080114-0305, te 121-0000000-0304.

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

1. Nicolle LE. Urinary tract infection in geriatric and institutionalized patients. *Curr Opin Urol* 2002;12:51-5.
2. Andrašević S, Tambić Andrašević A. Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus* 2006;15:245-50.
3. Heritage JM, Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum betalactamases in gram-negative bacteria. *JAC* 1999; 44:309-18.
4. Thomson KS. Minimizing quinolone resistance: are the new agents more or less likely to cause resistance? *JAC* 2000; 45:719-23.
5. Chaudhuri G, Giacoia GP, Yaffe SY. Drug development for pregnancy. U: Ragavan VV, ur. Drug development for women. Chichester: John Wiley and Sons, 1998:213-34.
6. Smaill F. Infections in obstetrics. U: O'Grady F, Lambert HP, Finch R, Greenwood D, ur. Antibiotic and chemotherapy. Antiinfective agents and their use in therapy. 7. izd. New York: Churchill Livingstone, 1997:800-14.
7. Olive G, Sureau C. Utilisation des médicaments chez la femme enceinte. U: Giraud JP, ur. Pharmacologie clinique, Bades de la Therapeutique. 2. izd. Paris: Expansion Scientifique Francaise, 1988:199-218.
8. Djelmiš J, Francetić I, Ivanišević M, Stanković A. Lijekovi u trudnoći i laktaciji. Beograd; Cosmos, 2006.
9. Čulig J, Štimac D. Izvanbolnička potrošnja lijekova u gradu Zagrebu. Zagreb: Zavod za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar, 2008.
10. Malm H, Martikainen J, Klaukka T, Neuvonen PJ. Prescription drugs during pregnancy and lactation – a Finnish register-based study. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59:127-33.
11. Czeizel AE, Rockenbauer M, Olsen J. Use of antibiotics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81:1-8.
12. Olesen C, Steffensen HT, and the Euromap group. Drug use in first pregnancy and lactation: a population-based survey among Danish women. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55:139-44.
13. Lacroix I, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Montastruc JL. Prescription of drugs during pregnancy in France. *Lancet* 2000; 356:1735-6.
14. Leppée M. Lijekovi u trudnoći. Disertacija. Medicinski fakultet u Osijeku, Osijek 2008.
15. Živković R. Klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2000.
16. Škerk V, Krhen I, Kalenić S, Francetić I. Smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava. *Liječ Vjesn* 2004;126:169-81.
17. Škerk Vi, Tambić-Andrašević A, Andrašević S, Markotić A, Škerk Ve. Prijedlog smjernica antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava – 2006 godina. *Infektol Glasn* 2006; 26:47-52.
18. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005; 40:643-54.
19. Romero R, Oyarzun E, Mazor M, Sirtori M, Hobbins JC, Bracken M. Metaanalysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obstet Gyn* 1989; 73:576-82.
20. Quiroga-Feuchter G, Robles-Torres RE, Ruelas-Moran A, Gomez-Alcala AV. Symptomatic bacteriuria among pregnant women. An underestimated threat. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2007; 45:169-72.
21. Krcmery S, Hromec J, Demesova D. Treatment of lower urinary tract infection in pregnancy. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:279-82.
22. Millar LK, Wing DA, Paul RH, Grimes DA. Outpatient treatment of pyelonephritis in pregnancy: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 1995; 86:560-4.
23. Vrhovac B, ur. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb: Medicinska naklada, 2007.
24. Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ, urednici. Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. New York: Churchill Livingstone, 2003.
25. Kammerer W, Mutschler E. Drugs in pregnancy – an overview. U: Freise K, Melchert F, ur. Arzneimitteltherapie in der Frauenheilkunde. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2002.
26. Boothby LA, Doering PL. FDA labeling system for drugs in pregnancy. *Ann Pharmacother* 2001; 35:1485-9.

Resistance of uropathogenic strains of *Escherichia coli* in pregnant women and other women in generative ages in comparison with antibiotics consumption in Zagreb

Josip Čulig^{1,2}, Ana Mlinarić-Džepina³, Marcel Leppée¹, Jasmina Vraneš^{3,4}

¹Reference Center for Pharmacoepidemiology, Andrija Stampar Institute of Public Health, Zagreb, ² Department of Pharmacology, Josip Juraj Strossmayer University Medical School, Osijek, ³Department of Microbiology, Andrija Stampar Institute of Public Health, Zagreb, ⁴Department of Microbiology and Parasitology, Zagreb University Medical School, Zagreb; Croatia

ABSTRACT

Aim To compare resistance of uropathogenic strains of *Escherichia coli* (UPEC) to antibiotics in women in generative ages and pregnant women during two year period (2004 and 2008) in Zagreb, and comparison of resistance and the consumption of antibiotics.

Methods The standard disk-diffusion method was used for sensitivity testing to 16 different antibiotics. Data on antibiotic utilization were used to calculate the number of defined daily doses (DDD) and DDD per 1000 inhabitants using Anatomical-Therapeutic-Chemical/DDD methodology. Data on antibiotic consumption during pregnancy were collected using a questionnaire filled in by 893 women after delivery.

Results During 2004 resistance of UPEC to antimicrobial drugs was not different in pregnant and in non-pregnant women, with the exception of amoxicillin and nitrofurantoin, with statistically higher resistance in pregnant women ($p < 0.01$). Four years later the statistically higher resistance to norfloxacin was observed in non-pregnant women ($p < 0.01$). Comparing the resistance in 2004 and 2008, in the both groups of women a statistically significant decrease of resistance to cefalexin and nitrofurantoin was detected ($p < 0.01$). Outpatient utilization of antimicrobial drugs in Zagreb increased significantly, from 32 to 39 DDD/1000 inhabitants per day. The most used antibiotic was co-amoxiclav, and its utilization increased from 9.6 to 12.2 DDD/1000/day. Amoxicillin and co-amoxiclav were used during pregnancy by 9.6% interviewed women.

Conclusion The observed significant decrease of resistance to cefalexin makes that antibiotic the drug of choice for treatment of urinary tract infections in women in generative ages, and together with co-amoxiclav can be administered in pregnancy. Constant monitoring of urinary tract pathogens resistance to antimicrobial agents ensures the effectiveness of empirical therapy, whose versatile use is limited due the potentially harmful effects of antimicrobial drugs on fetus.

Key words: urinary tract infections, drug utilization, pregnancy

Original submission: 29 September 2009.; **Revised version:** 12 December 2009; **Accepted:** 18 December 2009.

Značenje mikrobiološke dijagnostike u infekcijama urogenitalnog sustava žena u postmenopauzi

Blaženka Hunjak, Zdenka Peršić

Odjel za bakteriologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Cilj: Ustanoviti u kojem se postotku kod žena u postmenopauzi, koje pate od simptoma urinarne infekcije, mikrobiološkom pretragom može potvrditi infekcija, utvrditi najčešći uzročnici infekcija, te eventualna istovremena kolonizacija uretre i rodnice patogenim mikroorganizmima kod ispitanica s cistitisom.

Metode: U laboratorijima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu, u dvogodišnjem razdoblju, pregledani su uzorci 245 ispitanica s urinarnim simptomima, koje su bile najmanje jednu godinu u postmenopauzi. Kod svake ispitanice uzimani su uzorci urina, obrisci uretre i rodnice, koji su analizirani na uzročnike urogenitalnih infekcija, genitalne mikoplazme i klamidije.

Rezultati: Mikrobiološkom pretragom, cistitis je potvrđen kod 77 (31,4%), uretritis kod 61 (24,8%), a upala rodnice kod 37 (15,1%) ispitanica. Najčešći uzročnik uretritisa bila je *Ureaplasma urealyticum*, a infekcije rodnice *Gardnerella vaginalis*. Bakterija *Escherichia coli* istovremeno je izolirana iz uzoraka uretre i rodnice kod 28 (65,1%) ispitanica s *E. coli* cistitisom, a beta-hemolitički streptokok grupe B (BHSB) izoliran je istodobno u uretri i u rodnici kod svake ispitanice koja je imala BHSB cistitis.

Zaključak: Kolonizacija sluznice uretre i rodnice doprinosi učestalosti cistitisa kod žena u postmenopauzi. Provođenje mikrobiološke dijagnostike neophodno je zbog razlikovanja simptoma koji se javljaju uslijed starenja urogenitalnog sustava i onih koji se javljaju uslijed infekcije, a u cilju izbjegavanja provođenja nepotrebne antibiotske terapije.

Ključne riječi: infekcije mokraćnog sustava, bakterijska vaginoza, vaginitis, uretritis, postmenopauza

Corresponding author:

Blaženka Hunjak,
Hrvatski zavod za javno zdravstvo,
Odjel za bakteriologiju,
Rockefellerova 2, 10 000 Zagreb,
Hrvatska
Phone: +385 1 4863 292;
fax.: +385 1 4670 134
E-mail: blazenka.hunjak@hzjz.hr

Originalna prijava:

28. septembar 2009.;

Korigirana verzija:

15. decembar 2009.;

Prihvaćeno:

18. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):60-65

UVOD

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) jedne su od najčešćih bakterijskih infekcija žena svih dobnih skupina (1, 2). Godišnje se bilježi oko 150 miliona IMS-a na globalnom nivou.

Samo u Sjedinjenim Američkim Državama troškovi liječenja IMS-a prelaze šest milijardi dolara (2). Iako je poznato da IMS najčešće zahvaća populaciju žena generativne dobi, istraživanja pokazuju da učestalost infekcija raste s dobi. Bakteriurija, bez simptoma IMS-a, prisutna je kod 10-15% žena između 65 i 70 godina, te kod 15-20% žena starijih od 80 godina (3-5).

Za razliku od predisponirajućih faktora za IMS kod žena mlade dobi, predisponirajući faktori za nastanak IMS-a kod žena u postmenopauzi nisu dovoljno razjašnjeni (6).

Menopauza najčešće nastupa kod žena u razdoblju između 45. i 55. godine, stoga žene veliki dio svog životnog vijeka provedu u postmenopauzi (7). Epidemiološki podaci govore da je 1990. godine u svijetu bilo oko 467 miliona žena starih 50 i više godina (8), a da će 2030. godine ovaj broj narasti na 1.200 miliona (9).

Simptomi koji nastaju uslijed starenja urogenitalnog sustava i nedostatka estrogena, a dovode do smanjenja kvalitete života žena u *peri* i *post* menopauzi, sve se više prepoznaju zbog produženog očekivanog trajanja života i napretka u liječenju. Promjene koje se zbivaju tijekom menopauze mogu povećati osjetljivost urinarnog sustava na infekciju. Ove promjene uključuju povišeni pH vagine i promjene u flori rodnice, te zamjenu dominacije laktobacila u flori rodnice s gram-negativnim bakterijama (10). Zbog smanjenog lučenja estrogena, dolazi i do atrofije rodnice (11), što, također, pogoduje nastanku infekcija. Stoga su u donjem dijelu urinarnog sustava infekcijom najčešće zahvaćeni mokraćni mjehur i uretra, a u genitalnom sustavu rodnica.

Ciljevi ovog istraživanja bili su ustanoviti u kojem se postotku mikrobiološkom pretragom može potvrditi cistitis, uretritis ili upala rodnice, kod simptomatskih žena u postmenopauzi, utvrditi koji su najčešći uzročnici, te eventualnu istovremenu kolonizaciju uretre i rodnice patogenim mikroorganizmima kod ispitanica s cistitisom.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno u razdoblju od lipnja 2005. do siječnja 2008. u ginekološkim ordinacijama domova zdravlja Novi Zagreb, Sesvete i Kruge u Zagrebu. U studiju je bilo uključeno ukupno 245 ispitanica, koje su bile najmanje jednu godinu u postmenopauzi. Svaka od ispitanica imala je najmanje jedan od simptoma urinarne infekcije - dizuriju, polakizuriju ili urgenciju mokrenja, što je ustanovljeno anamnestički izravnom upitom pacijentice. Uputne dijagnoze nadležnih ginekologa bile su cistitis, uretritis, upala rodnice ili kronične upalne bolesti donjeg dijela mokraćnog sustava.

Uzimani su uzorci urina, obrisci uretre i rodnice, koji su analizirani na uzročnike urogenitalnih infekcija. Obrisci uretre ispitani su i na prisutnost genitalnih mikoplazmi i klamidije. Uzorci su uzimani tijekom ginekoloških pregleda u ambulantama primarne zdravstvene zaštite.

Za mikrobiološku analizu urina uzimani su uzorci dobiveni metodom srednjeg mlaza, prema nalogu Europskog društva za analizu urina (12). Obrisci uretre i rodnice uzimani su tijekom ginekološkog pregleda, te su dostavljeni u laboratorij u transportnim podlogama po Stuartu.

Uzorci urina kultivirani su na podlogama krvnog agara s dodatkom konjske krvi i selektivnoj podlozi za gram-negativne bakterije (MacConkey, Becton & Dickinson, SAD). Nakon 24h inkubacije u aerobnim uvjetima na 37°C, izvedena je identifikacija na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija (13), a potvrđena komercijalnim testovima (API, BioMerieux, Francuska).

Obrisci su kultivirani na podlogama krvnog agara s dodatkom konjske krvi, podlogama s koaguliranim krvlju (čokoladni agar) i podlogama s dodatkom ljudske krvi za identifikaciju *G. vaginalis*. Identifikacija mikroorganizama izvršena je na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija, a potvrđena komercijalnim testovima (API, BioMerieux, Francuska). Identifikacija bakterije *Gardnerella vaginalis* izvedena je temeljem mikroskopskog preparata, tipične morfologije i beta-hemolize na podlogama s humanom krvlju, negativnih reakcija katalaze i oksidaze, te testom osjetljivosti na metronidazol (disk od 80 µg).

Tablica 1. Rezultati mikrobiološke pretrage kod žena u post-menopauzi s urinarnim simptomima*

Uputna dijagnoza (245)	Broj (%) uputnih dijagnoza (ne potvrđenih mikrobiološkom analizom)	
	DA	NE
Cistitis	77 (31,4)	168 (68,6)
Uretritis	61 (24,8)	184 (75,2)
Upala rodnice	37(15,1)	208 (84,8)

*X²=18,24; p<0,01; statistički značajno manje mikrobiološki potvrđenih cistitisa, uretritisa ili upala rodnice od dijagnoza postavljenih u ordinaciji temeljem ginekološkog pregleda i simptoma pacijentica

Obrisci uretre i rodnice također su prikupljeni u transportni medij za genitalne mikoplazme, te su nasađeni i kultivirani na krutim i tekućim podlogama za bakterije *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*. Kultivacija je izvršena u mikroaerofilnim uvjetima. Identifikacija je izvršena na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija, a potvrđena komercijalnim testovima (API, BioMerieux, Francuska). Dodatna identifikacija genitalnih mikoplazmi rađena je molekularnom amplifikacijskom metodom (Real Time PCR, Applied Biosystem, SAD). Identifikacija *Chlamydia trachomatis* izvršena je PCR molekularnom metodom na aparatu COBAS AMPLICOR (Roche Diagnostics, Njemačka).

Bakteriološkom analizom ustanovljeni su uzročnici infekcije prema kriterijima za signifikantnu bakteriuriju objavljenim u *Smjernicama antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava* (14). Svaki uzorak urina pregledan je mikroskopski na prisutnost leukocita. Svi nalazi s patogenim izolatima praćeni su leukociturijom. Među uzročnike cistitisa svrstali smo gram-pozitivne (enterokok, beta-hemolitički streptokok grupe B - BHSB, *Staphylococcus aureus*) i gram-negativne bakterije (enterobakterije). Uzročnicima uretritisa smatrane su samo genitalne mikoplazme i klamidije, iako su u obriscima uretre nađene i uropatogene bakterije *G. vaginalis* i *C. albicans*. Uzročnik bakterijske vaginoze *G. vaginalis* i gljiva *Candida albicans* smatrani su uzročnicima upale rodnice.

Tablica 2. Distribucija urinarnih patogena prema vrstama uzoraka

Mikroorganizam	urin	uretra	rodnica
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>E. coli</i>	43 (55,8)	39 (49,3)	28 (49,1)
Beta-hemolitički streptokok grupe B (BHSB)	25 (32,4)	34 (43,0)	27 (47,3)
<i>Enterococcus</i> sp.	3 (3,8)	5 (6,3)	1 (1,7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1,2)	1 (1,2)	1 (1,7)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (1,2)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (2,5)	0	0
Ukupno*	75 (100)	79 (100)	57 (100)

* broj uzoraka s urinarnim patogenima

Tablica 3. Učestalost uzročnika uretritisa u istraživanoj populaciji u obriscima uretre i rodnice

Mikroorganizam	uretra	rodnica	ukupno
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Mycoplasma hominis</i>	1 (1,6)	0	1 (1,2)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	59 (96,7)	18 (100)	77 (97,4)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 (1,6)	0	1 (1,2)
Ukupno*	61 (100)	18 (100)	79

*broj uzoraka s uzročnicima nespecifičnog negonoričnog uretritisa

REZULTATI

Od 245 ispitanica, uključenih u studiju, dobiveno je ukupno 735 uzoraka - po 245 uzoraka urina, uretre i rodnice. Mikrobiološkom dijagnostikom kod 77 (31,4%) ispitanica ustanovljene su patogene bakterije u urinu, kod 172 (70,2%) u obrisku uretre, te kod 112 (45,7%) u obrisku rodnice. Cistitis je ustanovljen kod 77 (31,4%), uretritis kod 61 (24,8%), a infekcija rodnice kod 37 (15,1%) ispitanica s uputnom dijagnozom cistitisa, uretritisa, odnosno infekcije rodnice, te je infekcija rodnice statistički značajno rjeđe mikrobiološki potvrđena nego druge dvije dijagnoze (p<0,01) (Tablica 1.).

U uzorcima urina najčešće izolirani bakterijski patogeni bili su *E.coli* kod 43 (55,8%) i beta-hemolitički streptokok grupe B (BHSB) kod 25 (32,5%) pacijentica. Bakterija *Enterococcus* sp. izolirana je iz tri (3,9%) uzorka, *Staphylococcus aureus* iz dva (2,6%), a bakterije *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae* u jednom uzorku (1,3 %) (Tablica 2). *E. coli* i BHSB izolirane su iz 39 (49,4%), odnosno 34 (43,0%) uzorka, te su bili najčešće izolirani uropatogeni u obriscima uretre. Ostale uropatogene bakterije izolirane su malom broju uzoraka (Tablica 2). U obriscima uretre *U. urealyticum* je izolirana kod 59 (34,3%) obrisaka od ukupnog broja patogenih izolata u uretri, a *M. hominis* i *C. trachomatis* nađene su u po jednom uzorku obriska uretre (0,6%) (Tablica 3). *U. urealyticum* je nađena kao najčešći uzročnik uretritisa (96,7%). Od ukupno 112 uzoraka obrisaka rodnice s patogenim izolatima najčešće je bila izolirana *E. coli*, iz 28 (25%) uzoraka, *G. vaginalis* iz 19 (17%), te *U. urealyticum* i *C. albicans*, koje su izolirane iz 18 (16,0%) obrisaka rodnice.

Tablica 4. Zastupljenost uzročnika infekcija rodnice u uretri i rodnici

Mikroorganizam	uretra	rodnica	ukupno
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Candida albicans</i>	9 (28,12)	18 (48,64)	27 (39,13)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	23 (71,87)	19 (51,3)	42 (60,86)
Ukupno*	32 (100)	37 (100)	69

* broj uzoraka s uzročnicima bakterijske vaginoze i gljivičnih infekcija rodnice; X²=3,03; p>0,05

Od ukupno 37 žena s bakterijskom vaginozom ili gljivičnom infekcijom, *G. vaginalis* je bila češći izolat u 19 (51,35%) uzoraka, od *C. albicans* koja je dokazana kod 18 (48,6%) obrisaka, no ovi su mikroorganizmi bili podjednako zastupljeni i u uzorcima urina i uretre ($p > 0,05$) (Tablica 4.). Svaka od 25 ispitanica s cistisom uzrokovanim s BHSB-om imala je rodnicu i uretru istodobno koloniziranu s BHSB-om, za razliku od 43 ispitanice s cistitisom uzrokovanim s *E. coli*, među kojima je *E. coli* istodobno izolirana iz uretre i rodnice kod 28 (65,11%) žena. Enterokoki i *K. pneumoniae* izolirane su kod po jedne ispitanice u svakom od ispitivanih materijala.

DISKUSIJA

Infekcije mokraćnog sustava žena generativne dobi često su predmet istraživanja, za razliku od urinarnih infekcija žena u postmenopauzi (6). U ovom istraživanju svi uzorci dobiveni su od izvanbolničke populacije žena u postmenopauzi, a mikrobiološka obrada zatražena je zbog simptoma urinarnih infekcije. Od ukupnog broja ispitanica, mikrobiološkom pretragom cistitis je bio najčešće ustanovljena infekcija mokraćnog sustava (31,4%), a zatim uretritis (24,8%) i upala rodnice (15,1%). Hextall i sur. ustanovili su da je učestalost IMS-a kod žena u postmenopauzi između 20% i 50%, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (15). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su ženama u postmenopauzi infekcije mokraćnog sustava, uključujući cistitis i uretritis, veći problem od infekcija rodnice, budući da su ustanovljene u znatno manjem postotku od infekcija mokraćnog sustava. Moguće je da je u istraživanoj skupini postmenopauzalnih žena očuvana flora rodnice s predominacijom laktobacila, koji priječe razvoj infekcije rodnice. Oko 50% odraslih žena tijekom života ima barem jednu IMS (9, 10), a neke se bakterije, koje su dokazani uzročnici akutnih nekompliranih infekcija donjeg dijela mokraćnog sustava – cistitisa, mogu izolirati iz uretre i rodnice, kao što su *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, ali i *Enterococcus* sp. U ovom istraživanju najčešći uzročnik cistitisa bila je bakterija *E. coli* (55,8%), što je inače u skladu s izvještajima drugih autora (16, 17, 18). Međutim, BHSB je u ovom istraživanju izoliran kod 32,5% žena s cistitisom, a bakterije *S. aureus*, enterokok i *K.*

pneumoniae u znatno manjem postotku. Potrebno je osvrnuti se na činjenicu da je u ispitivanoj populaciji BHSB bio češći izolat od enterokoka. Nasuprot ovom rezultatu, istraživanja o etiologiji IMS-a u svijetu pokazuju da su vodeći uzročnici IMS-a kod žena među gram-pozitivnim bakterijama *Enterococcus* sp. i *S. saprophyticus* (19, 20). Međutim, enterokok u Hrvatskoj zauzima značajno mjesto među gram-pozitivnim uzročnicima infekcija općenito, za razliku od BHSB-a (21).

Beta-hemolitički streptokok grupe B dio je fiziološke flore urogenitalnog sustava žena (22), ali, ukoliko je izoliran u čistoj kulturi i broju višem od 10^4 kolonija, može se smatrati uzročnikom infekcije. Kod svake naše ispitanice, kod koje je izoliran BHSB, ustanovljena je leukociturija i potvrđeni su simptomi cistitisa, te je BHSB ubrojen među uzročnike IMS-a. Prema smjernicama za liječenje, svaka IMS praćena leukociturijom zahtijeva liječenje, bez obzira na uzročnika (14, 23).

Genitalne mikoplazme *M. hominis* i *U. urealyticum* dokazani su uzročnici uretritisa (ali ne uretralnog sindroma) kod žena (14). *U. urealyticum*, kao i BHSB, ima učinak na infekcije žena generativne dobi i perinatalne komplikacije, dok uloga u infekcijama žena u postmenopauzi još nije dokazana. Nadalje, genitalne mikoplazme izoliraju se u visokom postotku i kod zdrave populacije (24).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je *U. urealyticum* vrlo čest uzročnik negonoroičnog nespecifičnog uretritisa (96,7%). Visoka učestalost izolata *U. urealyticum* u uretri kod žena s urinarnim simptomima, upućuje na moguću važnu ulogu ove bakterije kod uretritisa žena u postmenopauzi. S obzirom da ureplazme spadaju u skupinu spolno prenosivih uzročnika, za pretpostaviti je da su naše ispitanice, unatoč postmenopauzi, bile spolno aktivne.

Iako je *C. trachomatis* dokazani uzročnik spolno prenosivih infekcija kod muškaraca i mladih žena, značajna uloga *C. trachomatis* u infekcijama donjeg dijela urogenitalnog sustava kod žena u postmenopauzi, ovim istraživanjem nije potvrđena. Naime, *C. trachomatis* izolirana je samo u jedne ispitanice.

Atrofične promjene sluznice urogenitalnog sustava kod žena u postmenopauzi imaju ulogu u patogenezi infekcija urinarnog sustava (11). Mogući uzročnici atrofičnog vaginitisa su bakterijska vaginoza, a najčešći uzročnici su *G. vaginalis*, *C. albicans* i *Trichomonas vaginalis*. Osim atrofičnog vaginitisa, i kolonizacija rodnice enterobakterijama povisuje osjetljivost sluznice na IMS (25). Od bakterijskih uropatogena u obriscima rodnice kod naših pacijentica ponovo su najčešće izolirani *E. coli* (49,1%) i BHSB (47,4%). Rezultati su pokazali i visoku učestalost izolata *G. vaginalis* (51,3 %) među patogenim izolatima u obriscima rodnice. Bakterijska vaginoza česti je problem žena u postmenopauzi, stoga bi bilo potrebno provesti liječenje kod simptomatskih žena s mikrobiološki potvrđenom infekcijom *G. vaginalis*. U svim dobima žene pate od gljivičnih vaginalnih infekcija, a naše istraživanje je pokazalo visok postotak izolata *C. albicans* u obriscima rodnice, te se, također, preporučuje terapija, ukoliko se mikrobiološki potvrdi gljivična infekcija.

Ovo istraživanje u skladu je s literaturom u kojoj se navodi da se IMS češće javljaju kod žena

kojima je rodnica kolonizirana istim bakterijama (26). Kod svake ispitanice s BHSB cistitisom ova bakterija je bila izolirana iz svih ispitanih uzoraka. Prema rezultatima ovog istraživanja, kolonizacija uretre i rodnice s BHSB-om doprinosi nastanku cistitisa, dok cistitis uzrokovan s *E. coli* nije uvijek praćen istodobnom kolonizacijom uretre i rodnice.

Mikrobiološka analiza pokazala je visoku učestalost izolata *U. urealyticum* (34,3%) u uretri. Međutim, podatak o značajnoj ulozi bakterije *U. urealyticum* u infekcijama mokraćnog sustava, treba uzeti s rezervom zbog visoke učestalosti *U. urealyticum* u zdravoj populaciji osoba bez simptoma (19).

Simptomi starenja urogenitalnog sustava često se preklapaju sa simptomima urinarne ili infekcije rodnice, a mikrobiološka dijagnostika može znatno pridonijeti razlikovanju urinarnih infekcija od simptoma izazvanih nedostatkom estrogena. Kod žena u postmenopauzi sa simptomima urinarne infekcije koja nije potvrđena mikrobiološkom pretragom, nije potrebno provoditi antimikrobnu terapiju, nego razmotriti ostale mogućnosti liječenja.

LITERATURA

- Schapert SM. National ambulatory medical care survey:1992 summary. Advanced data from vital and health statistics, no 253. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, DHHS publication, 1994: 94-1250.
- Ronald AR. Editorial comment:sexually transmitted diseases and urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 1995; 8:1-3.
- Nygaard IE, Johnson JM. Urinary tract infection in elderly women. *Am Fam Physician* 1996; 53:175-82.
- Nicolle LE. Urinary tract infection in elderly. *J Antimicrob Chemother* 1994, 33 (Suppl A):99-109.
- Boscia JA, Kobasa WD, Knight RA, Abrutyn E, Levison M, Kaye D. Epidemiology of bacteriuria in elderly ambulatory population. *Am J Med* 1986; 80:208-14.
- Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottersterich E, Rosenfeld S, Rottensterich E, Stamm W. Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis* 2000; 30:152-6.
- World Health Organization. Report of a WHO scientific group: Research on the menopause in the 1990's. WHO Technical Report Series 866. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1996.
- World Bank. World development report 1993 investing in health. New York: Oxford University Press, 1993.
- Meirik O, Banagiano H. Hormone replacement therapy.its impact on the risk of breast cancer. U: Pookin DR, Peddie LJ, ur. Women's health today. The proceedings of the XIV World Congress of Gynecology and Obstetrics. New York: Parthenon Publishing Group, 1994:337-42.
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The menopause. *Lancet* 1999; 353: 571-80.
- Podgajski M. Atrofični vaginitis u kliničkoj praksi. *Medix* 2003; 50:40-2.
- Kučišec-Tepeš N, Bejuk D. European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM): Europske upute za analizu urina. Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2000.
- Introduction to medical microbiology Part 2: Definitive laboratory diagnosis of infectious diseases. U: Koneman EW, Allen SD, Dowell JR, Janda WM, Sommers HM, Washington C, Winn JR JB, ur. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology .3. izd. Philadelphia: Lippincott Company, 1992:54-81
- Škerk V, Krhen I, Kalenić S, Francetić I. Smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava. *Liječ Vjesn* 2004; 126:169-81.
- Heextall A, Hooper R, Cardoso LD. Urogenital aging and the risk of urinary tract infection. The proceedings of the 23rd Annual meeting, International Urogynecology Association, Nov 18-21, 1998 Buenos Aires, Argentina. London: Springer; 1998. p. 305-361.

16. Wagenlehner FME, Niemetz A, Dahlhoff, Naber KG. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalized patients with urinary tract infections: 1994-2000. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19:557-64.
17. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS project. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:69-76.
18. Wagenlehner FME, Niemetz AH, Weidner W, Naber KG. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalized patients with urinary tract infections: 1994-2005. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31S:S25-S34.
19. Kim ME, Ha U-S, Cho Y-H. Prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in female outpatients in South Korea. A multicentre study in 2006. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31S:S15-S18.
20. Widstrom M, Wistrom J, Ferry S, Karlsson C, Monsen T. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1561-4.
21. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008. god. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009.
22. Kalenić S. Streptokoki. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E, ur. *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2001:188.
23. Naber KG, Bergman B, Bishop MC, Bjerklund - Johansen TE, Botto H, Lobel B, Jimenez Crz F, Selvaggi P. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU) EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. Urinary Tract Infection (UTI) Working Group of the Health Care Office (HCO) of the European Association of Urology (EAU). *Eur Urol* 2001; 40:576-88.
24. Swartz MA, Hooton TM. Etiology of nongonococcal nonchlamydial urethritis. *Dermatol Clin* 1998; 14:723-33.
25. Stamey TA, Sexton CC. The role of vaginal colonization with enterobacteriaceae in recurrent urinary tract infections. *J Urol* 1975; 113:214-17.
26. Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 1993; 329:753-6.

Evaluation of microbiological diagnostics in urogenital infections in postmenopausal women

Blaženka Hunjak, Zdenka Peršić

Department of Bacteriology, Croatian National Institute of Public Health

ABSTRACT

Objective To establish the percentage of infections in postmenopausal women with urinary symptoms which can be confirmed by microbiological analysis, the most common causative agents and whether the urethra and vagina in patients with cystitis are concurrently colonized by pathogenic microorganisms.

Methods Laboratories of the Croatian National Institute of Public Health in Zagreb, in the period of two years, analyzed 245 samples taken from patients with urinary symptoms who had been postmenopausal at least for a year. Urine samples, as well as urethral and vaginal swabs were taken from each patient and tested for causative agents of urogenital infections, genital mycoplasma and *Chlamydia trachomatis*.

Results Cystitis was confirmed by microbiological analysis in 31.4% women, urethritis in 24.8%, and vaginitis in 15.1%. The most common causative agent of urethritis was *Ureaplasma urealyticum*, while *Gardnerella vaginalis* was the most common in vaginal infections. *E. coli* was concurrently isolated in urine, urethral and vaginal samples in 65.1% of patients with *E. coli* cystitis, while *Streptococcus agalactiae* was isolated in urethral and vaginal samples in each patient with *Streptococcus agalactiae* cystitis.

Conclusion Mucosal colonization of the urethra and vagina contributes to the incidence of cystitis in postmenopausal women. Microbiological diagnostics is necessary to distinguish between the symptoms of ageing of the urogenital system and infection, with a view to preventing unnecessary antibiotic therapy.

Key words: urinary tract infections, bacterial vaginosis, vaginitis, urethritis, postmenopausal women

Original submission: 28 October 2009.; **Revised version:** 15 December 2009; **Accepted:** 18 December 2009.

Zastupljenost bakterija roda *Haemophilus* u uzorcima iz mokraćnog i genitalnog sustava

Vladimira Leskovar, Ana Mlinarić-Džepina, Tatjana Marijan, Jasmina Vraneš

Služba za mikrobiologiju i laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti prevalenciju, te antimikrobnu osjetljivost sojeva bakterija *Haemophilus influenzae* i *H. parainfluenzae* iz uzoraka mokraćnog i genitalnog sustava.

Metode: Sojevi bakterija roda *Haemophilus* spp. identificirani su API NH sistemom, a osjetljivost im je ispitana Kirby-Bauer disk difuzijskom metodom.

Rezultati: Iz ukupno 180.415 uzoraka iz urogenitalnog sustava izolirano je 50 (0,03%) sojeva *H. influenzae*, te 14 (0,01%) sojeva *H. parainfluenzae*. Kao uzročnici IMS-a, bakterije *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* izolirane su u značajnom broju ($\geq 10^4$ CFU/ml) u uzorcima mokraće djevojčica do 15 godina u 13 (0,88%), odnosno dva slučaja (0,13%), a kod dječaka samo u jednoj epizodi (0,11%) IMS-a (*H. influenzae*). Kod osoba fertile dob, kao uropatogen u uzorcima mokraće, nađena je bakterija *H. influenzae* kod pet (0,04%) žena, te tri (0,22%) muškarca. Kao uzročnik vulvovaginitisa, bakterija *H. influenzae* izolirana je kod četiri (5,63%), a bakterija *H. parainfluenzae* kod dvije (2,82%) djevojčice. Kod osoba fertile dob bakterija *H. influenzae* u velikom broju izolirana je iz 10 (0,49%) obrisaka cerviksa, te devet (1,74%) uzoraka osoba muškog spola, dok je bakterija *H. parainfluenzae* izolirana iz sedam (1,36%) uzoraka osoba muškog spola. Opaženo je da se u fertilejnoj dob *H. parainfluenzae* statistički značajno češće nalazi u urogenitalnom sustavu osoba muškog spola ($p < 0,01$). Ispitivanjem osjetljivosti sojeva *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* uočena je značajna rezistencija oba patogena jedino na kotrimoksazol, 26,0%, odnosno 42,9%.

Zaključak: U etiologiji infekcija mokraćnog sustava dječje dob, genitalnog sustava žena fertile dob, te muškaraca s epidimitisom i/ili orhitisom, važno je razmišljati i o ovim rijetkim i kultivacijski zahtjevnim bakterijama.

Ključne riječi: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, prevalencija, antimikrobna osjetljivost

Corresponding author:

Vladimira Leskovar,
Zavod za javno zdravstvo
„Dr. Andrija Štampar“,
Mirogojska 16, 10 000 Zagreb, Hrvatska
Phone: +385 1 4696 323;
fax. +385 1 4678 006
E-mail: vladimira.leskovar@stampar.hr

Originalna prijava:

30. august 2009.;

Korigirana verzija:

14. decembar 2009.;

Prihvaćeno:

16. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):66-71

UVOD

Haemophilus influenzae i *Haemophilus parainfluenzae*, kao komenzali sluznice gornjeg dije-la respiratornog sustava, nalaze se kod gotovo 75% zdrave djece i odraslih osoba. Infekcije koje uzrokuju ovi mikroorganizmi kod djece i odraslih, mogu biti - invazivne, poput meningitisa (1, 2), pneumonije (2), epiglotitisa (2, 3), celulitisa (3), bakterijemije (3), artritisa, te osteomijelitisa (4), koje većinom uzrokuju sojevi sa sposobnošću produkcije polisaharidne kapsule; odnosno - neinvazivne, poput otitis media (5), sinusitisa ili urogenitalnih infekcija (6-9), koje uzrokuju neinkapsulirani sojevi. Etiološka uloga bakterija *H. influenzae* i *H. parainfluenzae*, kao patogena urogenitalnih infekcija, do sada je dokazana u slučajevima infekcija mokraćnog sustava (IMS) kod djece i starijih osoba s funkcionalnim i anatomskim abnormalnostima sustava (8, 9), uretritisa u oba spola (6, 10, 11), epididimo-orhitisa (12, 13), cervicitisa i/ili vaginitisa (14-16), apscesa Bartolinijeve žlijezde (16, 17), endometritisa povezanog s intrauterinim uloškom (14, 15), tuboovarijskog apscesa (18), te brojnim opstetričkim komplikacijama poput korioamnionitisa ili prijevremenog puknuća plodnih ovoja (18-20). Rast ovih bakterija zahtijeva prisutnost faktora X (hemina) i/ili faktora V (nikotinamid adenin dinukleotida), što pri kultivaciji zahtijeva upotrebu podloga koje omogućavaju rast tih mikroorganizama, a rutinski se primjenjuju u radu našeg Laboratorija. Zahtjevnost kultivacije, te mogućnost pre-rastanja drugih mikroorganizama u miješanim kulturama, često dovodi do različitih podataka u literaturi o prevalenciji ovih bakterija u etiološkoj patogenezu infekcija urogenitalnog sustava.

Cilj ovog mikrobiološkog praćenja bio je odrediti prevalenciju i osjetljivost na antimikrobne lijekove izolata bakterija *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* iz uzoraka mokraćnog i genitalnog sustava.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za mokraćno-spolne infekcije Zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" retrospektivnom analizom rezultata mikrobiološke obrade uzoraka urogenitalnog sustava, u razdoblju od siječnja

2005. do prosinca 2008. godine. Uzorci čistog srednjeg mlaza prvog jutarnjeg urina, po dolasku u laboratorij, obrađeni su prema uputama za obradu i analizu uzoraka mokraće Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju (32, 33). Obrisci vagine, cerviksa, vulve, uretre, te glansa penisa, pristigli su u laboratorij uronjeni u Amies transportni medij s ugljenom (Biolab, Hungary), dok su uzorci ejakulata i ekstrimatata prostate prikupljeni u sterilnu transportnu posudicu. Uzorci genitalnog sustava rutinski su kultivirani na selektivni čokoladni agar (7% konjske krvi, AES Laboratoire, France), krvni agar (5% konjske krvi, AES Laboratoire, France), McConkey agar (AES Laboratoire, France), *Gardnerella vaginalis* agar (Columbia agar i GV suplementi, Oxoid LTD, United Kingdom), te Saboraud agar (Oxoid LTD, United Kingdom). Kultivirani mediji su potom inkubirani u atmosferi s 5% CO₂ na 35°C, kroz 18-20 sati, osim Saboraud agara koji je inkubiran u aerobnoj atmosferi na 35°C, kroz 18-20 sati, a potom 24 sata na sobnoj temperaturi. Karakteristične kolonije za bakterije roda *Haemophilus* identificirane su preparatom po Gramu, te komercijalnim API NH sistemom (bioMérieux, France). Bakterije roda *Haemophilus* spp. smatrane su uzročnicima infekcije urogenitalnog sustava ukoliko su izolirane u broju $\geq 10^4$ CFU/ml iz uzorka urina, odnosno u čistoj kulturi i značajnom broju iz uzoraka genitalnog sustava.

Osjetljivost sojeva ispitana je Kirby-Bauer disk difuzijskom metodom na *Haemophilus* testnom mediju (Oxoid LTD, United Kingdom), a sâm postupak, te interpretacija rezultata izvedena prema naputcima Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) (34). Pri ispitivanju osjetljivosti korišteni su diskovi (Bio-Rad, France) standardne potencije slijedećih antimikrobnih lijekova: ampicilina (10 µg), koamoksiklava (20/10 µg), cefuroksima (30 µg), ceftriaksona (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), tetraciklina (30 µg), te kotrimoksazola (1.25/23.75 µg). Produkcija enzima beta-laktamaze testirana je kromatogenom nitrocefinskom metodom (BD BBL™, USA) (36).

Prevalencija je promatrana kroz tri dobne skupine bolesnika - osoba mlađih od 15 (0-14) godina starosti, osoba fertile dobi (15-50 godina starosti), te osoba starijih od 50 godina starosti.

Tablica 1. Distribucija izolata *Haemophilus* spp. kod djevojčica starosti do 15 godina, s obzirom na vrstu uzorka

Vrsta uzorka	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka (%)	Broj izolata <i>H. influenzae</i> (%)	Broj izolata <i>H. parainfluenzae</i> (%)
Urin	7804	1485 (19,03)	13 (0,88)	2 (0,13)
Obrisak vulve/vagine	241	71 (29,46)	4 (5,63)	2 (2,82)
UKUPNO	8045	1556 (19,34)	17 (1,09)	4 (0,26)

REZULTATI

Tijekom četverogodišnjeg praćenja, iz 180.415 uzoraka mokraćnog i genitalnog sustava ukupno je izolirano 50 (0,03%) sojeva *H. influenzae*, te 14 (0,01%) sojeva *H. parainfluenzae*. Kod osoba mlađih od 15 (0-14) godina starosti obrađeno je 11.027 uzoraka urina i 254 uzoraka genitalnog sustava pri čemu je izolirano 18 (0,16%) sojeva *H. influenzae* i četiri (0,03%) soja *H. parainfluenzae*. Gotovo svi izolati potjecali su iz uzoraka osoba ženskog spola, osim jednog soja *H. influenzae* koji je izoliran u broju 10⁴ CFU/ml iz uzorka urina četverogodišnjeg dječaka.

Od ukupno 1.485 uzoraka urina kod kojih je dokazan uropatogen, *H. influenzae*, kao uzročnik infekcije mokraćnog sustava (IMS) djevojčica, izoliran je u 13 (0,88%), a *H. parainfluenzae* u 2 slučaja (0,13%). Kao uzročnik vulvovaginitisa *H. influenzae* je izoliran u četiri (5,63%), a *H. parainfluenzae* u dva (2,82%) slučaja (Tablica 1).

Kod osoba fertile dob (od 15-50. godine starosti) u laboratoriju je obrađeno 62.917 uzoraka urina, te 5.246 raznovrsnih uzoraka genitalnog sustava osoba ženskog spola, te 9.924, odnosno 2.474 uzoraka urogenitalnog sustava osoba muškog spola (Tablica 2). Kao uzročnik IMS-a, *H. influenzae* je izoliran kod pet (0,04%) žena, te kod tri (0,22%) muškarca, dok *H. parainfluenzae* nije izoliran. U obriscima cerviksa, uretre (oba spola), te uzorcima ejakulata bolesnika, *H. influenzae* je izoliran u 19 (0,75%) uzoraka (10 obrisaka cerviksa, 8 obrisaka uretre osoba muškog spola i u jednom uzorku ejakulata), a *H. parainfluenzae* u 7 (0,28%) uzoraka (pet obrisaka uretre muškarca

Tablica 3. Antimikrobna rezistencija sojeva *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* iz uzoraka mokraćnog i genitalnog trakta

Antimikrobni lijek	Broj rezistentnih izolata (%)	
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>
amoksicilin	3 (6,0)	4 (28,6)
koamoksiklav	0	0
cefuroksim	0	0
ceftriakson	0	0
tetraciklin	4 (8,0)	4 (28,6)
kotrimoksazol	13 (26,0)	6 (42,9)
ciprofloksacin	0	0

i u dva uzorka ejakulata). *H. parainfluenzae* značajno je češće izoliran kao patogen genitalnog sustava kod osoba muškog spola u odnosu na žensku populaciju (p<0,01). Iz ostalih 198 uzoraka genitalnog sustava osoba oba spola fertile dob (obriska vagine, vulve, glansa penisa, te ekspri-mata prostate) *Haemophilus* spp. nije izoliran.

Kod osoba starijih od 50 godina, iz uzoraka mokraćnog i genitalnog sustava oba spola, ukupno je izolirano osam (0,009%) sojeva *Haemophilus* spp. Kod žena starije životne dobi *H. influenzae* je izoliran u tri (0,02%) uzorka urina, dok je *H. parainfluenzae* izoliran kod tri (0,02%) osobe ženskog spola (jedan soj iz uzorka urina, a druga dva iz obriska cerviksa). Kod muškaraca starije životne dobi, iz uzoraka ejakulata, u dva (0,03%) slučaja izoliran je *H. influenzae* uz prisutnost velikog broja polimorfonuklearnih leukocita u uzorku.

Gotovo svi izolati obje vrste bakterija bili su osjetljivi na beta-laktamske antimikrobne lijekove, osim sedam (10,94%) kod kojih je rezistencija na amoksicilin nastala uslijed produkcije enzima beta-laktamaze, što je potvrđeno kromatogenom nitrocefinskom metodom. Dok rezistencija na ciprofloksacin nije zabilježena, na tetraciklin je intermedijarna osjetljivost opažena u dva (4%) soja *H. influenzae*, a rezistencija u 4 (8%) sojeva, dok je kod *H. parainfluenzae* zabilježena kod 4 (28,6%) izolata. Najviša prevalencija rezistencije opažena je na kotrimoksazol, kod 13 (26%) i 6 (42,9%) izolata *H. influenzae*, odnosno *H. parainfluenzae* (Tablica 3).

Tablica 2. Distribucija izolata *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* s obzirom na spol kod osoba fertile dob (15-50 godina)

Vrsta uzorka	Broj uzoraka		Broj pozitivnih uzoraka (%)		Broj izolata <i>H. influenzae</i> (%)		Broj izolata <i>H. parainfluenzae</i> (%)	
	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž
	Urin	9924	62917	1384 (13,95)	12619 (20,06)	3 (0,22)	5 (0,04)	0
Obrisak cerviksa	-	4780	-	1868 (39,08)	-	10 (0,53)	-	0
Obrisak uretre	358	275	56 (15,64)	86 (31,27)	8 (14,28)	0	5 (8,93)	0
Ejakulat	2109	-	458 (21,72)	-	1 (0,22)	-	2 (0,44)	-
Ostali uzorci genitalnog sustava	7	191	2 (28,57)	59 (30,89)	0	0	0	0

DISKUSIJA

Novo područje istraživanja bakterija roda *Haemophilus* jeste njihov patogeni značaj u infekcijama urogenitalnog sustava, a što posljednjih tri-desetak godina privlači pažnju istraživača. Isprva u literaturi su bili opisani tek sporadični slučajevi IMS-a (21), epididimo-orhitisa (12), te uretritisa (22), povezani s ovim mikroorganizmima. Nakon što je uočena povećana incidencija neonatalne sepse uzrokovane *H. influenzae* (19, 20), kao i urogenitalnih infekcija, te opstetričkih komplikacija kod žena (18-20), što se povezivalo s kolonizacijom ovim patogenom genitalnog sustava žene i ascendentnim putem infekcije (23), uslijedile su brojne studije incidencije izolata bakterija *H. influenzae* i *H. parainfluenzae* iz uzoraka urogenitalnog sustava. Dok su Sturm (11) i Drouet (10) ustanovili prevalenciju od 5,3%, odnosno 6,3% izolacije ovih patogena iz uzoraka urogenitalnog sustava, Vazquez je zamijetio nižu prevalenciju (2,8%) (16). Najnižu prevalenciju (0,2%) zabilježio je Verweij (6) koji je iz 3.329 obrisaka cerviksa, te 3.279 obrisaka vagine, izolirao svega 12 sojeva bakterije *H. influenzae*. Niska prevalencija ovih patogena iz uzoraka urogenitalnog sustava zabilježena je i u ovom istraživanju. Osim razlika u prevalenciji od studije do studije, zamijećena je i razlika u zastupljenosti ove dvije vrste bakterija u uzorcima, pa se učestalost izolacije bakterije *H. influenzae* kretala između 0,7% (10, 16) i 1,3% (11), a učestalost bakterije *H. parainfluenzae* između 1,6% (16) do 5,6% (10). Rezultati našeg istraživanja govore o niskoj prevalenciji (0,35%) ovih mikroorganizama iz uzoraka genitalnog sustava kod osoba fertile dobi, što vjerojatno nije posljedica primjene manje osjetljivih metoda kultivacije ovih mikroorganizama, već različitih ciljnih populacija i geografskih razlika u prevalenciji. Već ranije zamijećena, značajno veća učestalost izolacije *H. parainfluenzae* kod osoba muškog spola, dokazana je i u ovom istraživanju (8, 35).

Kod djece do 14 godina starosti, bakterija *H. influenzae* smatra se rijetkim patogenom mokraćnog sustava. Učestalost IMS-a, prema rezultatima studija incidencije španjolskih (24) i švedskih autora (8), povezanih s ovim patogenom jeste 0,88%. Identičan postotak (0,88%) pronađen je i u ovom istraživanju, a potvrđena je i, već ra-

nije zamijećena, znatno češća izolacija ovog mikroorganizma iz uzoraka urina kod djevojčica u odnosu na dječake, te iznimno rijetka izolacija *H. parainfluenzae*. Kao uzročnik vulvovaginitisa kod djevojčica, *H. influenzae*, prema navodima iz literature, nalazi se na drugom mjestu po učestalosti, nakon *Streptococcus pyogenes* (8, 25). Postotak izolacije *H. influenzae*, kao uzročnika vulvovaginitisa, u ovom je istraživanju (1,66%) vrlo sličan rezultatu studije engleskog autora (3,74%), te nešto niži od rezultata istog autora šest godina ranije (10,0%) (26). Kao najčešći patogen vulvovaginitisa u ovome istraživanju, dokazana je bakterija *S. pyogenes*, dok su drugi uzročnici, kao što su *Enterobacteriaceae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus* spp., te *H. influenzae*, izolirani s podjednakom učestalošću.

Kod osoba starije životne dobi, bakterije roda *Haemophilus* rijetko se nalaze kao uzročnici IMS-a ili infekcija genitalnog sustava (9), što su pokazali i rezultati ovog istraživanja. Potrebno je istaknuti da se IMS dječje (8) ili starije životne dobi (9), uzrokovane ovim patogenima, povezuju s funkcionalnim ili anatomskim abnormalnostima urogenitalnog sustava, pa je stoga u etiologiji infekcija urinarnog sustava kod osoba s anomalijama, u dijagnostici važno upotrijebiti metode pogodne za kultivaciju ovih uzgojno zahtjevnih bakterija.

U ovom istraživanju opažena je rezistencija na amoksisilin u 10,9% (u svim slučajevima povezana s produkcijom beta-laktamaza), te na tetraciklin i kotrimoksazol u 12,5%, odnosno 29,7% izolata *Haemophilus* spp. Svi izolati bili su osjetljivi na ciprofloksacin. Rezistencija *Haemophilus* spp. na istovjetne antimikrobne lijekove, no u nešto višem postotku, opažena je i u drugim studijama (6, 26, 27), kao i njihova osjetljivost na fluorokinolone (28). U Hrvatskoj preporučeni prvi izbor antimikrobnih lijekova u liječenju IMS-a, osim u slučaju nekomplikiranog cistitisa kod žena, jesu koamoksiklav, cefalosporini II/III generacije, te ciprofloksacin (29, 30). U sindromu prostatitisa prvi izbor antimikrobnog lijeka je ciprofloksacin (31). S obzirom na preporuke, te opaženu rezistenciju bakterija roda *Haemophilus*, navedena terapija omogućava adekvatnu terapiju IMS-a, te infekcija genitalnog sustava uzrokovanih ovim mikroorganizmima.

U etiologiji infekcija mokraćnog sustava dječje dobi, genitalnog sustava žena fertilne dobi, te muškaraca s epididimitisom i/ili orhitisom, važno je razmišljati i o rijetkim uzročnicima kao što je *Haemophilus* spp., te upotrijebiti dijagnostičke

metode koje će omogućiti izolaciju ovih kultivacijski zahtjevnih bakterija.

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

- Cabellos C, Verdaguer R, Olmo M, Fernández-Sabé N, Ciscal M, Ariza J, Gudíol F, Viladrich PF. Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years. *Medicine (Baltimore)* 2009; 88:115-9.
- McConnell A, Tan B, Scheifele D, Halperin S, Vadudry W, Law B, Embree J; of The Canadian Immunization Monitoring Program, ACTive (IMPACT). Invasive infections caused by *Haemophilus influenzae* serotypes in twelve Canadian IMPACT centers, 1996-2001. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:1025-31.
- Sakata H. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 1996-2005, before the introduction of *H. influenzae* type b vaccination. *J Infect Chemother* 2007; 13:30-4.
- Howard AW, Viskontas D, Sabbagh C. Reduction in osteomyelitis and septic arthritis related to *Haemophilus influenzae* type B vaccination. *J Pediatr Orthop* 1999; 19:705-709.
- Sekiya Y, Eguchi M, Nakamura M, Ubukata K, Omura S, Matsui H. Comparative efficacies of different antibiotic treatments to eradicate nontypeable *Haemophilus influenzae* infection. *BMC Infect Dis* 2008; 8:15.
- Verweij PE, Meis JF. Colonization of the female genital tract with *Haemophilus influenzae*. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:758.
- Casin I, Sanson-Le Pors MJ, Felten A, Perol Y. Biotypes, serotypes, and susceptibility to antibiotics of 60 *Haemophilus influenzae* strains from genitourinary tracts. *Genitourin Med* 1988; 64:185-8.
- Hansson S, Svedhem A, Wennerström M, Jodal U. Urinary tract infection caused by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in children. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:1321-5.
- Demetrios P, Constantine B, Demetrios S, Nikolaos A. *Haemophilus influenzae* acute pyelonephritis in the elderly. *Int Urol Nephrol* 2002; 34:23-4.
- Drouet EB, Denoyel GA, Boude MM, Boussant G, de Montclos HP. Distribution of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* biotypes isolated from the human genitourinary tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8:951-5.
- Sturm AW. Isolation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* from genital-tract specimens with a selective culture medium. *J Med Microbiol* 1986; 21:349-52.
- Greenfield SP. Type B *Haemophilus influenzae* epididymo-orchitis in the prepubertal boy. *J Urol* 1986; 136:1311-3.
- Weber TR. *Haemophilus influenzae* epididymo-orchitis. *J Urol* 1985; 133:487.
- Andreu A, Coira A. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*: etiologic agents of sexually transmitted diseases? *Med Clin (Barc)* 1989; 92:321-3.
- Hall GD, Washington JA. *Haemophilus influenzae* in genitourinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983; 1:65-70.
- Vázquez F, Andrés MT, Palacio V, Vázquez S, de Lillo A, Fierro JF. Isolation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in genitourinary infections: a 4-year review. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14:181-5.
- Mikamo H, Tamaya T, Tanaka K, Watanabe K. Two cases of Bartholin's gland abscesses caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Jpn J Antibiot* 2005; 58:375-81.
- Kraggsbjerg P, Nilsson K, Persson L, Törnqvist E, Vikerfors T. Deep obstretical and gynecological infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Scand J infect Dis* 1993; 25:341-6.
- Kinney JS, Johnson K, Pappasian C, Hall RT, Kurth CG, Jackson MA. Early onset *Haemophilus influenzae* sepsis in the newborn infant. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12:739-43.
- Takala AK, Pekkanen E, Eskola J. Neonatal *Haemophilus influenzae* infections. *Arch Dis Child* 1991; 66:437-40.
- Morgan MG, Hamilton-Miller JM. *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae* as urinary pathogens. *J Infect* 1990; 20:143-5.
- Chowdhury MN, Pareek SS. Urethritis associated with *Haemophilus parainfluenzae*: a case report. *Sex Transm Dis* 1983; 10:45-6.
- Martínez MA, Ovalle A, Ulloa MT, Vidal RM. Role of *Haemophilus influenzae* in intra-amniotic infection in patients with preterm rupture of membranes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:890-2.
- Galán F, García-Martos P, Mira J. Urinary tract infection caused by *Haemophilus* spp. in pediatrics: a rarely studied disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14:483-5.
- Cox RA. *Haemophilus influenzae*: an underrated cause of vulvovaginitis in young girls. *J Clin Pathol* 1997; 50:765-8.
- Cox RA, Slack MP. Clinical and microbiological features of *Haemophilus influenzae* vulvovaginitis in young girls. *J Clin Pathol*. 2002; 55:961-4.
- Albritton WL, Brunton JL, Meier M, Bowman MN, Slaney LA. *Haemophilus influenzae*: comparison of respiratory tract isolates with genitourinary tract isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16:826-31.

28. Quentin R, Koubaa N, Cattier B, Gavignet M, Goudeau A. In vitro activities of five new quinolones against 88 genital and neonatal *Haemophilus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:147-9.
29. Škerk V, Tambić Andrašević A, Andrašević S, Markotić A, Škerk V. Antimikrobno liječenje i profilaksa infekcija mokraćnog sustava odraslih osoba. *Medicus* 2006; 15:251-6.
30. Škerk V, Tambić Andrašević A, Andrašević S, Sušić E, Mlinarić Džepina A, Mađarić V, Milutinović S, Krhen I, Perić Lj, Bagatin Lj, Čorić M, Ferlin D, Cazin I, Tomac G. ISKRA smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava – hrvatske nacionalne smjernice. <http://iskra.novikod.com/Upload/Smjernice/Pilot/ims.pdf> (12.12.2009.)
31. Krhen I, Škerk V, Schoenwald S, Jakšić J. Osnovne smjernice za liječenje prostatitisa, *Medicus* 2002; 11:271-6.
32. Aspevall O, Hallander H, Grant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microb Infect* 2001; 7:173-8.
33. Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1150-8.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement, CLSI Document M100-S19. Pennsylvania, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
35. Messing M, Sottnek FO, Biddle JW, Schlater LK, Kramer MA, Kraus SJ. Isolation of *Haemophilus* species from the genital tract. *Sex Transm Dis* 1983; 10:56-61.
36. Ferreira JA, Castro AC, Rocha MP, Riboldi G, d'Azevedo PA. Beta-lactamase production *Haemophilus* spp. and resistance to ampicillin in a general hospital in Porto Alegre city, RS, Brazil (2001-2005). *Braz J Infect Dis* 2007; 11:50-52.

Frequency of *Haemophilus* spp. in urinary and genital tract samples

Vladimira Leskovar, Ana Mlinarić-Džepina, Tatjana Marijan, Jasmina Vraneš

Department of Microbiology and Laboratory diagnostics "Dr. Andrija Štampar" Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Aim To determine the prevalence and antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae* isolated from the urinary and genital tracts.

Methods Identification of strains bacteria *Haemophilus* spp. was carried out by using API NH identification system, and antibiotic susceptibility was performed by Kirby-Bauer disk diffusion method.

Results A total number of 50 (0,03%) *H. influenzae* and 14 (0,01%) *H. parainfluenzae* (out of 180, 415 samples) were isolated from genitourinary tract. From urine samples of the girls under 15 years of age these bacteria were isolated in 13 (0,88%) and two (0,13%) cases, respectively, and only in one case (0,11%) of the UTI in boys (*H. influenzae*). In persons of fertile age, it was only *H. influenzae* bacteria that was found in urine samples of the five women (0,04%) and in three men (0,22%). As a cause of vulvovaginitis, *H. influenzae* was isolated in four (5,63%), and *H. parainfluenzae* in two (2,82%) girls. In persons of fertile age, *H. influenzae* was isolated from 10 (0,49%) smears of the cervix, and in nine (1,74%) male samples. *H. parainfluenzae* was isolated from seven (1,36%) male samples. ($p < 0.01$). Susceptibility testing of *H. influenzae* and *H. parainfluenzae* revealed that both pathogens were significantly resistant to cotrimoxazol only (26.0% and 42.9%, respectively).

Conclusion In the etiology of genitourinary infections of girls during childhood, genital infections of women in fertile age (especially in pregnant women), and men with cases of epididymitis and/or orchitis, it is important to think about this rare and demanding bacteria in terms of cultivation.

Key words: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, prevalence, antibiotic susceptibility

Original submission: 30 September 2009.; **Revised version:** 14 December 2009; **Accepted:** 16 December 2009.

Detekcija i tipizacija humanih papiloma virusa metodom polimorfizma restrikcijskih fragmenata u žena s različitim citološkim nalazom

Lidija Žele-Starčević¹, Vanda Plečko^{1,2}, Vesna Tripković¹, Ana Budimir^{1,2}, Branka Bedenić^{1,2}, Zlatko Topalović³

¹Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, ²Zavod za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ³Dom zdravlja Centar; Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Cilj ovoga rada bio je istražiti postotak genotipova visokog rizika, koji nisu uključeni u vakcinu trenutno dostupnu na tržištu, u žena s različitim citološkim nalazima, te na temelju učestalosti pojedinih genotipova, procijeniti zaštitnu ulogu dostupnih cjepiva.

Metode: U istraživanje je uključeno 70 žena s različitim citološkim nalazima (25 žena s CIN 1, 25 žena s CIN 2/3 i 20 žena s urednim citološkim nalazom) kojima je iz obrisaka vrata maternice PCR reakcijom, uz začetnice MY09/MY11, dokazana prisutnost DNA HPV-a. Genotipizacija HPV-a napravljena je RFLP metodom.

Rezultati: U čak 38,8% uzoraka svih skupina žena nađeni su genotipovi visokog rizika koji nisu uključeni u trenutno dostupne vakcine; u skupini žena s urednim citološkim nalazom, ovi genotipovi nađeni su u čak 29,9% uzoraka. Dokazani su genotipovi visokog rizika u 47% uzoraka žena s normalnim citološkim nalazom, dok su u žena s CIN 1 nađeni u 64%, a u žena s CIN 2/3 u 94% uzoraka.

Zaključak: Navedeni rezultati upućuju da bi kod više od trećine ispitanica postojeća cjepiva bila minimalne djelotvornosti, no potrebna su daljnja istraživanja koja bi uključila veći broj ispitanica.

Ključne riječi: HPV, RFLP, genotipizacija, cjepivo

Corresponding author:

Lidija Žele-Starčević,
Klinički zavod za kliničku i molekularnu
mikrobiologiju
Klinički bolnički centar Zagreb,
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, Hrvatska
Phone: +385 1 492 0026
Fax: +385 1 459 0130
E-mail: lidija.zele@zg.t-com.hr

Originalna prijava:

25. oktobar 2009.;

Korigirana verzija:

14. decembar 2009.;

Prihvaćeno:

18. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):72-78

UVOD

Humani papiloma virusi (HPV) vrlo su raznovrsna grupa virusa čiji genom čini DNK. Pokazuju afinitet za pločasti epitel i uzrokuju infekciju karakteriziranu neobičnim prirodnim tijekom koji je najčešće supklinički, s mogućim rijetkim, ali ozbiljnim posljedicama (1-3). HPV infekcija jedna je od najčešćih spolno prenosivih infekcija (*engl. sexually transmitted infection – STI*) virusne etiologije. Primjerice, u SAD-u se svake godine registrira 5,5 milijuna novih slučajeva; procjenjuje se da je 20 milijuna Amerikanaca inficirano ovim virusom (4).

Epidemiološka istraživanja pokazuju da 50% žena postane inficirano HPV-om unutar dvije godine od početka seksualnog života (4-6). Međutim, točnu je prevalenciju teško utvrditi zbog velikog broja asimptomatskih i supkliničkih infekcija (7, 8), kao i zbog teškog razlikovanja recidiva i reinfekcije (9). Procjenjuje se da su supkliničke ili latentne infekcije među mladim, seksualno aktivnim ljudima, češće nego kondilomi; prevalencija se općenito navodi od 20% – 50% (10).

U Hrvatskoj ove infekcije su, također, najčešće spolno prenosive infekcije (11-17). U jednom epidemiološkom istraživanju, DNK virusa nađena je u obrisku vrata maternice u 60% seksualno aktivnih žena (18).

Kao i ostale STI, HPV genitalne infekcije se, također, najčešće pojavljuju kod mladih, spolno aktivnih ljudi; incidencija je najveća u dobi od 20. do 24. godine, te naglo opada nakon 40. godine (7, 19-21).

Postoje različite podjele HPV-a: prema genetičkoj srodnosti, onkogenom potencijalu i afinitetu za pojedina tkiva. Prema genetičkoj srodnosti razvrstani su u različite genotipove. Do danas je poznato više od 150 različitih genotipova HPV-a, a svakodnevno se otkrivaju novi (22). Međutim, samo njih 40-tak ima afinitet za anogenitalni epitel (22). Na temelju epidemioloških i molekularnobioloških istraživanja, te kliničkih zapažanja, utvrđeno je nedvojbeno značenje HPV infekcija u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) i karcinoma cerviksa (22). U skladu s onkogenim promjenama, dijele se u HPV visokog i niskog rizika. U genotipove visokog rizika uključeni su 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68,

73 i 82. Genotipovi 26, 53, 66, prema nekim autorima, za sada se smatraju genotipovima vjerojatno visokog rizika (22). Potrebno je istaknuti da se ova podjela stalno mijenja i dopunjuje novim genotipovima (22, 23). Zastupljenost genotipova varira u odnosu na geografske regije. U Sjevernoj Americi i Europi, HPV 16 je najčešći genotip visokog rizika (1).

U dosadašnjim istraživanjima u Hrvatskoj, također je utvrđeno da je od genotipova visokog rizika najčešći genotip 16, a po učestalosti ga slijede 31 ili 18 i 33 (11-17); međutim, nisu rađena velika multicentrična istraživanja, koja bi obuhvatila veliki dio populacije.

Profilaktičke vakcine pružaju tipno-specifičnu zaštitu; zaštita od genotipova HPV-a koji nisu uvršteni u vakcinu je minimalna i temelji se na unakrsnoj zaštiti (24). U Hrvatskoj je odobrena četverovalentna vakcina („Gardasil“, MSD, SAD) koja pruža zaštitu od dva najčešća genotipa visokog rizika (HPV 16 i HPV 18) i dva najčešća genotipa niskog rizika (HPV 6 i HPV 11), te dvovalentna vakcina (HPV 16 i HPV 18) („Cervarix“, GSK, UK).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi koliki je postotak genotipova visokog rizika, koji nisu uključeni u cjepiva, utvrđen u obriscima cerviksa.

PACIJENTI I METODE

Istraživanje je uključilo 70 žena s različitim citološkim nalazima (25 žena s CIN 1, 25 žena s CIN 2/3 i 20 žena s urednim citološkim nalazom) kod kojih je PCR reakcijom, uz korištenje začetnice MY09/MY11, dokazana prisutnost DNA HPV-a. Uzorci su bili izabrani metodom slučajnih brojeva između pozitivnih uzoraka, koji su stigli u Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb, u periodu od 01. 09. 2003. do 01. 10. 2004. godine.

Uzorci za ispitivanje bili su obrisci vrata maternice. Uzimani su prema indikacijama pri rutinskom ginekološkom pregledu i pohranjeni u komercijalni transportni medij HC 2 (Digene Specimen Collection Kit, Silver Spring, Maryland, SAD). Iz istog uzorka rađena je i genotipizacija. Do obrade su bili pohranjeni na -20°C. Prisutnost DNA HPV-a u uzorcima dokazivana je PCR reakcijom, uz korištenje dva degenerativna gru-

pno-specifična oligonukleotida, MY09/MY11, koji umnožavaju dio gena L1 veličine 450 bp koji obuhvaća više od 50 različitih genotipova. Za svaki uzorak korištena je interna kontrola. Specifičnost produkata PCR reakcije određivana je elektroforezom. Za genotipizaciju je korištena metoda cijepanja dobivenih amplifikata restrikcijским enzimima (engl. *restriction fragment length polymorphism – RFLP*) koja se ne temelji na određivanju redosljeda nukleotida. Dio gena L1, omeđen spomenutim oligonukleotidima MY09 i MY11, cijepan je restrikcijским enzimima. To su jedini početni oligonukleotidi za koje je razvijena osjetljiva metoda genotipizacije koja ima visoku osjetljivost i specifičnost, a koja se ne temelji na određivanju redosljeda nukleotida. Nakon cijepanja, fragmenti su elektroforetski razdvojeni. Genotipovi su određeni prema specifičnom rasporedu fragmenata (25).

Uzorci su testirani i Digene Hybrid Capture 2 metodom (HC 2), koristeći obje probe (A i B) koje sadrže mješavinu začetnica za pet genotipova niskog, odnosno 13 genotipova visokog rizika (26, 27).

REZULTATI

Od ukupno 70 uzoraka, u tri uzorka, uzetih od žena s urednim citološkim nalazom, nije umnožena dovoljna količina DNK HPV koja je potrebna za genotipizaciju RFLP metodom. HC 2 metodom samo je jedan uzorak bio negativan (jedan od tri uzorka u kojima nije umnožena količina

DNK HPV koja je potrebna za genotipizaciju). Ukupno je genotipizirano 67 uzoraka i dobiveno 17 različitih genotipova. Najčešće zastupljeni bili su HPV 16 (39,6%) i HPV 31 (10,4%). Slijedeći po učestalosti bio je HPV 6 (7,5%). U dva uzorka (3,0%) nije se uspio odrediti genotip (označeni su kao genotipovi X), a u četiri uzorka nađena je miješana infekcija (6,0%).

Najčešći genotip u svim skupinama žena bio je HPV 16. Učestalost mu raste s rastućim stupnjem citoloških promjena; nađen je kod 23,5% žena s urednim citološkim nalazom, kod 28% žena s CIN 2, odnosno kod 60% u žena s CIN 2 i/ili 3. Od genotipova visokog rizika sličnu učestalost u svim skupinama žena imao je genotip 31. Nađen je kod 11,7% žena s urednim citološkim nalazom, kod 8% žena s CIN 1 i kod 12% žena s CIN 2 i/ili 3. Od genotipova visokog rizika relativno je često (5,9%) izoliran HPV 58 koji nije nađen jedino kod žena s najvećim stupnjem citoloških promjena. Također, nađena je relativno visoka učestalost genotipa 53. HPV 33 nije nađen jedino u skupini žena s CIN 1. Najzastupljenija dobna skupina žena bila je između 20. i 30. godine života. Naime, to je generativno doba i doba povećane spolne aktivnosti, kada su i ostale spolno prenosive bolesti najčešće, te se ova dobna skupina žena češće javlja ginekologu. U ovoj skupini žena učestalost genotipova visokog rizika koji nisu prisutni u cjepivima iznosi (78,9%), a samo tip 31 nađen je u šest uzoraka žena ove dobne skupine (60% od ukupnog broja žena) (Tablica 1 i 2).

Raspodjela genotipova u žena, s obzirom na dob, te citološki nalaz, prikazuju Tablice 2 i 3. Broj različitih genotipova bio je podjednak u svim skupinama žena (devet kod žena s urednim citološkim nalazom, 11 kod žena s CIN 1 i osam kod žena s CIN 2 i/ili 3). Nije uočena statistički značajna

Tablica 1. Raspodjela genotipova prema dobnim skupinama

Genotip	Dobne skupine				Ukupno
	≤20	21-30	31-40	≥41	
HPV6	2	8	4	0	14
HPV11	0	1	1	0	2
HPV16	5	25	3	2	35
HPV18	1	1	1	0	3
HPV31	2	6	2	0	10
HPV33	2	1	0	0	3
HPV39	0	0	0	1	1
HPV40	1	0	1	0	2
HPV52	1	0	0	0	1
HPV53	1	3	0	0	4
HPV56	2	0	0	0	2
HPV58	0	5	0	0	5
HPV 61	0	1	0	0	1
HPV73	0	1	1	0	2
HPV62	1	0	1	0	2
16+70	0	1	0	0	1
58+X	0	1	0	0	1
54+X	0	1	0	0	1
66+x	0	1	0	0	1
33+x	0	0	1	0	1
Ostali	1	1	1	1	4
Ukupno	19	57	16	4	96

Tablica 2. Dobne skupine u odnosu na onkogeni potencijal HPV-a

Genotip	Dobne skupine				Ukupno
	≤20 N (%)	21-30 N (%)	31-40 N (%)	≥41 N (%)	
Visoki rizik	13 (68,3)	41 (71,9)	8 (50,0)	3 (75,0)	65 (67,7)
Niski rizik	4 (21,1)	11 (19,3)	7 (43,8)	0	22 (22,9)
Vjerojatno visoki rizik	1 (5,3)	4 (7,0)	0	0	5 (5,2)
Ostali	1 (5,3)	1 (1,8)	1 (6,2)	1 (25,0)	4 (4,2)
Ukupno	19 (100,0)	57 (100,0)	16 (100,0)	4 (100,0)	96 (100,0)

razlika u zastupljenosti pojedinih genotipova u odnosu na citološki nalaz ($p > 0,05$), osim u zastupljenosti genotipa 16, čija je učestalost značajno češća u skupini žena s CIN 2 i/ili 3 ($p < 0,05$).

DISKUSIJA

Najvažnija posljedica HPV genitalne infekcije jeste karcinom vrata maternice. Po učestalosti je u svijetu na drugom mjestu (procjenjuje se da se u svijetu godišnje javlja 500.000 novih slučajeva), a među vodećim uzrocima smrti na petom. 2001. godine od ove bolesti u svijetu je umrlo oko 258.000 žena, od toga 30.000 u Europi (5, 28-30). Šestogodišnja prospektivna studija, u kojoj je u Amsterdamu bilo pregledano 405 žena, pokazala je da je za nastanak CIN 3 isključivo odgovorna perzistentna infekcija visokorizičnim genotipovima HPV-a (31).

Prevalencija visokorizičnih genotipova HPV-a, dokazana u različitim populacijama žena u svijetu, kreće se između 25-45% kod žena s CIN 1, između 60-80% kod žena s CIN 2 i između 90-95% kod žena s CIN 3 (32, 33). U ovom istraživanju učestalost genotipova visokog rizika u cervikalnim uzorcima žena s CIN 1 bila je viša (64%), dok je u uzorcima žena s CIN 2 i/ili 3 bila podjednaka kao u drugim istraživanjima (94%).

U nedavno objavljenoj meta-analizi o povezanosti genotipova HPV-a i karcinoma vrata mater-

nice, uključeno je 85 istraživanja (34). HPV 16 nađen je u oko 50% karcinoma, a HPV 18 u 10% do 14% tumora. To je samo potvrdilo dosadašnja saznanja da je HPV 16 najčešći genotip nađen u karcinomu vrata maternice. Ostali izolirani genotipovi bili su slijedeći (poredani po učestalosti): HPV 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 i 70 (34).

Bosch i suradnici 1995. godine objavili su rezultate velikog multicentričnog istraživanja među ženama s karcinomom vrata maternice, koje je obuhvatilo 22 zemlje (5). Nađeno je više od 20 različitih genotipova; HPV 16 bio je najčešće izoliran genotip u svim zemljama, osim u Alžiru i Indoneziji gdje je HPV 18 bio najčešće izoliran genotip. U svim ostalim zemljama HPV 18 bio je po učestalosti na drugom mjestu. I u drugim istraživanjima, u žena s karcinomom vrata maternice HPV 16 i 18 su najčešće izolirani genotipovi (35, 36), osim na Tajvanu i u Kini gdje je na drugom mjestu po učestalosti bio genotip 58 (37-39).

U svim istraživanjima u Hrvatskoj, HPV 16 bio je najučestaliji, dok je u nekim istraživanjima na drugom mjestu bio genotip 18 (16, 18). Prema rezultatima ovog istraživanja, slijedeći po učestalosti bio je genotip 31, a isti rezultat dobili su i Grahovac i suradnici (15). Međutim, na trećem mjestu nađen je genotip 58, što se razlikuje od ostalih istraživanja u Hrvatskoj (11-18). Također je nađen HPV 39, koji, prema nama dostupnim podacima, nije utvrđen ni u jednom istraživanju u Hrvatskoj. Ove razlike u učestalosti pojedinih genotipova, kao i otkrivanje nekih rjeđih, mogu se djelomično objasniti primjenom različitih metoda za genotipizaciju, veličinom uzorka, ali bi mogli biti i posljedica različite raspodjele genotipova u različitim regijama u Hrvatskoj.

Vrlo je zanimljivo da su rezultati istraživanja o raspodjeli genotipova u populaciji žena s urednim citološkim nalazom različiti, kako u učestalosti, tako i u prisutnosti određenih genotipova ovisno u odnosu na pojedine geografske lokalizacije. U ovom istraživanju, u skupini žena s urednim citološkim nalazom, genotipovi visokog rizika nađeni su kod čak 47% uzoraka što se ne opisuje u radovima drugih autora. Jacobs i sur. su 2000. godine, u Nizozemskoj, u populaciji od 3.305 žena s urednim citološkim nalazom našli 3,3% genotipova visokog rizika (40). Najčešće

Tablica 3. Raspodjela genotipova kod žena s različitim citološkim nalazom

Genotip	Žene s različitim citološkim nalazom			Ukupno N (%)
	uredan	CIN 1	CIN 2 i/ili 3	
6	4	1	0	5 (7,5)
11	1	0	0	1 (1,5)
16	4	7	15	2 (38,8)
18	0	1	1	2 (3,0)
31	2	2	3	7 (10,4)
33	1	0	1	2 (3,0)
39	0	0	1	1 (1,5)
40	1	1	0	2 (3,0)
52	0	0	1	1 (1,5)
53	1	2	1	4 (5,9)
56	0	2	0	2 (3,0)
58	1	3	0	4 (5,9)
61	1	0	0	1 (1,5)
62	0	2	0	2 (3,0)
73	0	0	1	1 (1,5)
X	1	1	0	2 (3,0)
16 + 70	0	1	0	1 (1,5)
33 + X	0	0	1	1 (1,5)
54 + X	0	1	0	1 (1,5)
58 + X	0	1	0	1 (1,5)
Ukupno	17	25	25	67 (100,0)
Broj različitih genotipova	9	11	8	17

izolirani genotipovi bili su 16, 31 i 18. U radovima drugih autora, u ovoj skupini žena, uz visok postotak infekcije s HPV-om 16 i 31, nađeni su genotipovi koji u Nizozemskoj nisu nađeni, primjerice, HPV 53, 73 i MM4 u Češkoj (36).

Rozendaal i suradnici pokazali su da žene s HPV-om visokog rizika i urednim citološkim nalazom vrata maternice, imaju 116 puta veći rizik za razvoj CIN 3, u usporedbi sa ženama s urednim citološkim nalazom kod kojih nije pronađen HPV visokog rizika (41). Slične rezultate objavili su još neki autori (5, 32, 42).

Zbog toga je uvođenje profilaktične vakcine veliki napredak u prevenciji karcinoma vrata maternice. Trenutno prisutna cjepiva pružaju zaštitu od dva genotipa visokog rizika (HPV 16 i HPV 18)

koji se najčešće povezuju s nastankom karcinoma vrata maternice. Međutim, ova vakcina pruža minimalnu zaštitu od ostalih genotipova visokog rizika; unakrsna zaštita dokazana je samo za nekoliko genotipova (HPV 31, HPV 45) (43).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da bi kod više od trećine ispitanica potencijalna upotreba cjepiva bila minimalne djelotvornosti, a potrebno je provesti veće istraživanje, te istražiti učestalost pojedinih genotipova na većem broju uzoraka da bi se dobila prava slika o distribuciji pojedinih genotipova u našoj populaciji.

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

1. Zehbe I, Wilander E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol* 1997; 181:270-5.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-F78.
3. Brentjens MH, Yeung-Yue KA, Lee PC, Tying SK. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin* 2002; 20:315-31.
4. Cates W. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex Transm Dis* 1999; 26:S2-S7.
5. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-801.
6. Baseman JG and Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Jour Clin Virol* 2005; 32S:S16-S24.
7. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171:1026-30.
8. Van Doornum GJ, Prins M, Juffermans LH, Hooikaas C, van den Hoek JA, Coutinho RA, Quint WG. Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. *Genitourin Med* 1994; 70:240-6.
9. Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus: epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20:235-55.
10. Wikström A, Popescu C, Forslund O. Asymptomatic penile HPV infection: a prospective study. *Int Jour of STD & AIDS* 2000; 11:80-4.
11. Grce M, Husnjak K, Bozikov J, Magdić L, Zlacki M, Lukac J, Fističić I, Sikanić-Dugic N, Pavelić K. Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* 2001; 21:579-84.
12. Grce M, Husnjak K, Magdić L, Ilijas M, Zlacki M, Lepusić D, Lukac J, Hodek B, Grizelj V, Kurjak A, Kusić Z, Pavelić K. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 1997; 13:645-51.
13. Grce M, Husnjak K, Skerlev M, Lipozenčić J, Pavelić K. Detection and typing of human papillomavirus by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res* 2000; 20:2097-102.
14. Vince A, Ivanišević M, Harni V, Skalko D, Jeren T. *J Clin Virol* 2001; 20: 91 – 94.
15. Grahovac M, Racić I, Hadzisejdić I, Dorić A, Grahovac B. Prevalence of Human Papillomavirus among Croatian Women Attending Regular Gynecological Visit. *Coll Antropol* 2007; 31 (Suppl. 2):73-7.
16. Kaliterna V, Anđelinović Š, Pejković L and Drmić Hofman I. Human Papillomavirus DNA Typing in the Cervical Specimens among Women of Split and Dalmatian County. *Coll. Antropol* 2007; 31 (Suppl. 2):79-82.
17. Marijan T, Vranes J, Mlinarić-Dzjepina A, Leskovar V, Knezević J, Kvaternik M. Genital Human Papillomavirus Infection in Women from the Zagreb Region. *Coll. Antropol* 2007; 31 (Suppl. 2):83-7.
18. Milutin-Gasperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective Study of the Prevalence of High-Risk Human Papillomaviruses among Croatian Women. *Coll. Antropol* 2007; 31 (Suppl. 2) 89-96.
19. Wieland U, Pfister H. Papillomaviruses in human pathology; epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross G, Barrasso, eds. *Human papillomavirus infection. A Clinical Atlas*. Berlin, Wiesbaden: Ullstein Mosby, 1997:1 – 16.
20. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71:2449-56.

21. Archard HO, Heck JW, Stanley HR. Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosal lesion found in Indian children. *Oral Surg* 1976; 20:201-12.
22. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
23. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-37.
24. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 2005; 23:2388-94.
25. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170:1077-085.
26. Poljak M, Brencic A, Seme K, Vince A, Marin IJ. Comparative evaluation of first- and second-generation Digene Hybrid Capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1999; 37:796-7.
27. Clavel C, Masure M, Levert M, Putaud I, Mangeon-jean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Human papillomavirus detection by Hybrid Capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9:145-50.
28. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiologic and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14:95-105.
29. Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B, Schopp B, Garbrecht-Buettner S, Davies P, Boehmer G, van den Akker E, Iftner T. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* 2003; 88:1570-7.
30. Hsing-Pei L, Yang-Yan H, Hsueh-Yin W, Jau-Tsuen K. Method for testing for human papillomavirus infection in patients with cervical intraepithelial disease. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 366 – 368.
31. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354:20-5.
32. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:958-64.
33. Nindl I, Lotz B, Kühne-Heid R, Endisch U, Schneider A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1999; 52:17-22.
34. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88:63-73.
35. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998; 70:115-20.
36. Tachezy R, Hamsíková E, Hájek T, Mikysková I, Smahel M, Van Ranst M, Kanka J, Havránková A, Rob L, Guttner V, Slavík V, Anton M, Kratochvíl B, Kotrsová L, Vonka V. Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV 16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 1999; 58:378-86.
37. Gonzales-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-Gonzales N, Puerto-Solis M. High prevalence of papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *Clin Virol* 2004; 29; 202-5.
38. Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol* 1999; 59:232-8.
39. Lai HC, Sun CA, Yu MH, Chen HJ, Liu HS, Chu TY. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related types. *Int J Cancer* 1999; 84:5537.
40. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N, Meijer CJ. Distribution of 37 musosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000; 87: 221-7.
41. Meijer CJL Van De Brule AJC, Snijders PJF, Helmerhorst T, Kenemans P, Walboomers JMM. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. U In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A, editors. *The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1992:271-81. ; 1992. p. 271-81.
42. Rozendaal L, Walboomers JM, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ, van Ballegooijen M, Meijer CJ. PCR- based high risk HPV test in cervical-cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996; 68:766-9.
43. Paaavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group, Greenacre M. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374:301-14.

Detection and typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism in women with different cytology

Lidija Žele-Starčević¹, Vanda Plečko^{1,2}, Vesna Tripković¹, Ana Budimir^{1,2}, Branka Bedenić^{1,2}, Zlatko Topalović³

¹ Department for Clinical and Molecular Microbiology of Clinical Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia; ²Department for Medical Microbiology and Parasitology of Medical School Zagreb, Zagreb, Croatia; ³Outpatient Clinic Centre; Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Aim The aim of this study was to determine a percentage of high risk genotypes which are included in the current vaccines in women with different cytology and on the basis of obtained results to evaluate the protective activity of the current vaccines.

Methods Endocervical swabs were taken from 70 women with different cervical cytology (25 women with CIN 1, 25 women with CIN 2/3 and 20 women with negative cytology). The samples were tested by PCR method using MY09/MY11 primers to determinate the HPV status, especially the percentage of high risk genotypes which are not included in the current vaccines. Genotyping was done by RFLP method.

Results In as much as 38.8% of all samples high risk genotypes (hrHPV), not included in the current vaccine, were detected; in a group of women with normal cytology hrHPV genotypes were found in 29.9% samples. HrHPV were found in 47%, and 64% of samples taken from women with normal cytology and CIN 1, respectively, while in women with CIN 2 /3 hrHPV were found in 94%.

Conclusion These results indicate that in more than in one third of tested women the current available vaccines would be of minimal protective activity, but further studies which should include more women are needed.

Key words: HPV, RFLP, genotyping, vaccines

Original submission: 25 October 2009.; **Revised version:** 14 December 2009; **Accepted:** 18 December 2009.

NOTES

Infekcije mokraćnog sustava, uzrokovane enterobakterijama koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), kod populacije na području Primorsko-goranske županije u Republici Hrvatskoj

Brigita Tićac^{1,2}, Nilia Volarević¹, Palmira Keso-vija¹, Maja Farkaš¹, Dolores Peruć¹, Silvana Udovičić-Gobić¹, Tomislav Rukavina^{1,3}

¹Mikrobiološki odjel, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije; ²Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; ³Katedra za socijalnu medicinu i epidemiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; Rijeka, Hrvatska

Corresponding author:

Brigita Tićac,
Mikrobiološki odjel, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Krešimirova 52a, 51 000 Rijeka;
Phone: +385 51 358 768; fax: +385 51 358 775;
E-mail: brigita.ticac@zjzjzpgz.hr;

Originalna prijava: 10. septembra 2009.; Korigirana verzija: 04. decembra 2009.; Prihvaćeno: 16. decembra 2009.

Med Glas 2010; 7(1):79-83

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja jeste odrediti prevalenciju pojedinih uropatogena, te zastupljenost sojeva koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), među sojevima koji su izolirani iz urina izvanbolničkih pacijenata s područja Primorsko-goranske županije u Republici Hrvatskoj. Retrospektivno smo analizirali rezultate dobivene pretragom 44 321 mikrobiološke kulture urina, u razdoblju od 01. 01. 2008. do 30. 06. 2009. godine. Rezultati studije su pokazali da ESBL proizvodi 189 (1,8%) od ukupno 10 757 izolata. Zastupljenost ESBL izolata bila je 19% za vrstu *Klebsiella pneumoniae*, 0,6% za vrstu *Escherichia coli*, te 5,2% za vrstu *Proteus mirabilis*. Zbog geografskih različitosti, nužno je pratiti lokalnu prevalenciju i osjetljivost uropatogena, kako bi se olakšalo provođenje empirijskog liječenja.

Ključne riječi: beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), uropatogeni, infekcije mokraćnog sustava

UVOD

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) česte su u izvanbolničkoj praksi i nerijetko se njihovom liječenju pristupa empirijskom primjenom antibiotika (1). Empirijska terapija temelji se na podacima o učestalosti izolacije pojedinih patogena i njihovoj osjetljivosti (2). Mikrobiološke pretrage urina (urinokulture) ne predstavljaju samo po-

moć prilikom postavljanja dijagnoze i liječenju IMS, već analiza dobivenih rezultata omogućava objektivnije sagledavanje lokalnih specifičnosti glede zastupljenosti pojedinih izolata i njihove osjetljivosti na antibiotike (3). Potonje je osobito značajno u liječenju rekurentnih i kompliciranih IMS koje češće uzrokuju multiplorezistentni patogeni (4). Antimikrobno liječenje, u svakom slučaju, mora biti prije svega usmjereno prema pretpostavljenom ili dokazanom uzročniku infekcije (1). Nekomplicirane infekcije mokraćnog sustava, u općoj populaciji, obično uzrokuje uropatogena *Escherichia coli*, a zatim predstavnici iz roda *Klebsiella* i ostale enterobakterije, te enterokoki (2). Komplicirane, odnosno rekurentne infekcije, češće su uzrokovane enterobakterijama rodova *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, te nefermentirajućim gram-negativnim bacilima vrste *Pseudomonas aeruginosa* i roda *Acinetobacter* (5).

Proizvodnja beta-laktamaza najznačajniji je mehanizam rezistencije gram-negativnih bakterija na antibiotike. Sposobnost produkcije beta-laktamaza širokog spektra u gram-negativnih bakterija dokazana je prije više od četiri desetljeća (6). Posljednjih dvadesetak godina s povećanom učestalošću, u svijetu se bilježi izolacija gram-negativnih sojeva koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *ESBL, extended spectrum β -lactamases*), rezistentne na sve beta-laktame, osim karbapenema (7). S različitom učestalošću ESBL sojevi, prije svega *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, pojavljuju se i kao uzročnici infekcija kod izvanbolničke populacije (8).

Retrospektivnom analizom rezultata dobivenih mikrobiološkim pretragama urina u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije u Rijeci (Republika Hrvatska), željeli smo utvrditi učestalost ESBL izolata najčešćih uropatogena u uzorcima koji su na analizu dostavljeni iz ordinacija opće prakse.

MATERIJAL I METODE

U razdoblju od 01. siječnja 2008. do 30. lipnja 2009. godine, u Laboratoriju za urogenitalne infekcije Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo u Rijeci, obrađivani su uzorci urina bolesnika s područja Primorsko-goranske županije (300.000 stanovnika). Uzorci su na mikrobiološku pretragu dostavljeni iz 14 pedijatrijskih i 54 ordinacije opće prakse. U retrospektivnoj

analizi koristili smo podatke iz računalne baze medicinske dokumentacije Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije u Rijeci.

Uzorci urina dobiveni su srednjim mlazom i u Laboratorij dostavljeni u sterilnim transportnim bočicama. Neposredno po zaprimanju, urinokulture su naciepljivane na CPS ID 3 kromogeni agar (bioMérieux, Francuska) 10 µL-skim ezom, te aerobno inkubirane na 37°C kroz 24 sata.

Identifikacija izoliranih sojeva izvršena je biokemijskim testovima, uz primjenu standardnih laboratorijskih protokola i komercijalnih kitova (API, bioMérieux, Francuska) (9).

Osjetljivost na antibiotike ispitivana je tehnikom disk difuzije, prema metodi Bauer-Kirby (10), koja je usklađena s laboratorijskim preporukama CLSI-a (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (11). Detekcija gram-negativnih sojeva koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra, određivana je ispitivanjem sinergizma između klavulanata i beta-laktama pomoću dvostrukog disk difuzijskog testa (engl. *Double-Disk Diffusion Assay - DD*), izvođenog prema preporukama za disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti na Mueller-Hinton agaru (12, 13). Diskovi s 30 µg ceftazidima, ceftriaksona i cefotaksima, stavljani su (na udaljenosti od 25 mm od ruba) oko diska s amoksicilinom (20µg) i klavulanskom kiselinom (10 µg). Povećana zona inhibicije, u prisutnosti klavulanske kiseline, ukazivala je na moguću ESBL produkciju izolata. Sinergistički učinak klavulanata s cefotaksimom i ceftazidimom potvrđen je korištenjem komercijalnih E-testova (AB Biodisk, Švedska).

REZULTATI

U razdoblju od 01. 01. 2008. – 30. 06. 2009. godine, obrađen je 44 321 uzorak urina izvanbol-

ničkih bolesnika. Mikrobiološkom obradom, negativan nalaz utvrđen je kod 34 263 uzoraka, a 10 058 uzoraka bilo je pozitivno (23%). U navedenom razdoblju, ukupno je izolirano 10 757 sojeva bakterija. Najčešći izolirani uropatogen bila je *Escherichia coli* (57,3%). Po učestalosti, slijedi izolacija *Enterococcus* spp. (14,7%), zatim izolacija bakterija iz rodova *Klebsiella* (6,6%) i *Proteus* (6,2%). Udio ostalih gram-negativnih fermentirajućih i nefermentirajućih bakterija bio je, po zastupljenosti izolacija, niži od 5% (Tablica 1).

Za 189 gram-negativnih sojeva, što iznosi 1,8% od ukupnog broja izolata, utvrđeno je da proizvode beta-laktamaze proširenog spektra.

Najčešći su ESBL-pozitivni bili izolati vrste *Klebsiella pneumoniae*, kojih je, u razdoblju obuhvaćenom analizom, bilo 120 (1,1% svih izolata), odnosno 19% od 631 izoliranog soja vrste *Klebsiella pneumoniae*. Proizvodnja beta-laktamaza proširenog spektra dokazana je kod 0,6% od 6 159 izolata vrste *Escherichia coli* (0,3% svih izolata), te kod 5,2% izoliranih bakterija vrste *Proteus mirabilis* (0,3% svih izolata) (Tablica 2).

DISKUSIJA

Infekcije mokraćnog sustava ubrajamo među najučestalije bakterijske infekcije u izvanbolničkoj i bolničkoj medicinskoj praksi. Obolijevaju osobe oba spola i svih dobnih skupina, a češće se javljaju kod žena u reproduktivnoj dobi. Antimikrobna terapija infekcija mokraćnog sustava često se započinje empirijski, dok još nisu poznati uzročnik i njegova osjetljivost na antibiotike (14). Cilj antibiotskog liječenja jeste nestanak kliničkih simptoma i eradikacija uzročnika sa svrhom prevencije rekurirajućih infekcija (1). Dok se osjetljivost uzročnika nekada mogla predvidjeti, danas je, zbog sve raširenije rezistencije bakterija na antibiotike, pri odabiru empirijske antimikrobne terapije IMS-a neophodno poznavati učestalost rezistencije u određenoj geografskoj regiji (8, 15). U većini slučajeva, ESBL se izoliraju kod *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, ali su, ta-

Tablica 1. Distribucija izolata iz uzoraka urina

Izolirani uzročnik	Broj izolata (%)
<i>Escherichia spp.</i>	6 159 (57,26)
<i>Enterobacter spp.</i>	310 (2,88)
<i>Serratia spp.</i>	121 (1,12)
<i>Citrobacter spp.</i>	87 (0,81)
<i>Proteus spp.</i>	663 (6,16)
<i>Morganella spp.</i>	116 (1,08)
<i>Klebsiella spp.</i>	711 (6,61)
<i>Pseudomonas spp.</i>	247 (2,3)
<i>Acinetobacter spp.</i>	55 (0,51)
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	8 (0,07)
<i>Burkholderia spp.</i>	1 (0,01)
<i>Alcaligenes spp.</i>	2 (0,02)
<i>Aeromonas spp.</i>	2 (0,02)
<i>Achromobacter spp.</i>	1 (0,01)
<i>Staphylococcus spp.</i>	240 (2,23)
<i>Streptococcus spp.</i>	455 (4,23)
<i>Enterococcus spp.</i>	1 579 (14,68)
UKUPNO	10 757 (100)

Tablica 2. ESBL-negativni i ESBL-pozitivni izolati iz uzoraka urina izvanbolničkih bolesnika na području Primorsko-goranske županije u Republici Hrvatskoj

Izolirani uzročnik	No. ESBL-negativnih (%) izolata	No ESBL-pozitivnih (%) izolata
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	511 (81,0)	120 (19,0)
<i>Escherichia coli</i>	6 124 (99,4)	35 (0,6)
<i>Proteus mirabilis</i>	616 (94,8)	34 (5,2)
Ostali	3 317 (100,0)	0 (0)
UKUPNO	10 568 (98,2)	189 (1,8)

kođer, detektirane i u slučajevima infekcija s drugim vrstama iz porodice *Enterobacteriaceae*, kao što su *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, te gram-negativnim nefermentirajućim bakterijama vrste *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. (16). U pravilu radi se o multirezistentnim izolatima koji danas predstavljaju sve veći izazov u antibiotskom liječenju. Prevalencija ESBL gram-negativnih izolata različita je u pojedinim zemljama, a, prema nekim podacima iz literature, globalna prevalencija iznosi oko 25% (17).

Iz urinokultura izvanbolničkih pacijenata s područja naše županije, od siječnja 2008. do konca lipnja 2009. godine, izolirano je 189 ESBL sojeva, što predstavlja 2% gram-negativnih izolata, odnosno 1,8% ukupnog broja izolata.

U Hrvatskoj udio sojeva *Escherichia coli* koji produciraju ESBL iznosi 2%, a sve češće se viđaju i u izvanbolničkoj sredini (3). Iako je *Escherichia coli* najčešći uzročnik urinarnih infekcija kod populacije naših bolesnika (57,3% izolata), udio ESBL *Escherichia coli* sojeva iznosi svega 0,4% gram-negativnih izolata, odnosno 0,3% ukupnog broja izolata. Za 19% *Klebsiella pneumoniae*, izoliranih u razdoblju obuhvaćenom našom retrospektivnom analizom, dokazana je sposobnost proizvodnje beta-laktamaza proširenog spektra. U odnosu na broj izoliranih gram-negativnih sojeva, ESBL *Klebsiella pneumoniae* izolati bili su zastupljeni s 1,4% (1,1% svih izolata). Prema podacima iz literature, zbog većeg udjela ESBL sojeva među izolatima *Klebsiella pneumoniae* (preko 20%), posebice u bolničkim sredinama, otežano je empirijsko liječenje urinarnih infekcija. Pojava ESBL izolata mogla bi u budućnosti utjecati na antibiotsko liječenje izvanbolničkih pacijenata s infekcijama mokraćnog sustava (3, 18).

Rekurentne i komplicirane infekcije mokraćnog sustava češće uzrokuju enterobakterije iz rodova *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, te nefermentirajući gram-negativni bacili vrste *Pseudomonas aeruginosa* i roda *Acinetobacter* (20). Prema našim rezultatima, *Proteus mirabilis*, nakon vrsta *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, najčešći je gram-negativni uropatogen. Iako su, u većini slučajeva, izolati bili osjetljivi na beta-laktamske antibiotike, produkcija beta-laktamaza proširenog spektra ustanovljena je u oko 5% sojeva izoliranih iz urina (0,4% gram-negativnih, odnosno 0,3% svih izolata).

Poznati su rizični čimbenici povezani s povećanom učestalošću rezistentnih izolata. Kod izvanbolničke populacije, kao predisponirajući čimbenici, navode se ranija hospitalizacija, dijabetes, rekurentne infekcije, dugotrajna primjena penicilina i kinolona, a, posebice, neracionalno korištenje snažnih ESBL induktora, kao što su cefalosporini treće generacije (ceftazidim) (19). Izolacija rezistentnih patogena obično je češće povezana s kompliciranim infekcijama mokraćnog sustava i primjenom urinarnih katetera (20). Iz dostupne medicinske dokumentacije nismo bili u mogućnosti izvršiti analizu čimbenika koji su mogli imati utjecaja na pojavu ESBL izolata kod naših bolesnika. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je prevalencija ESBL izolata u uzorcima urina naših pacijenata od svega 1,8%, u korelaciji s manjom zastupljenosti kompliciranih IMS-a kod izvanbolničkih pacijenata na području županije.

Iako prevalencija ESBL izolata iz urina izvanbolničkih pacijenata s područja Primorsko-goranske županije nije visoka, dobiveni rezultati ukazuju na potrebu stalnog praćenja učestalosti izolacije pojedinih patogena i kretanja rezistencije, kako bi se odabirom djelotvornog antibiotskog liječenja što brže eradicalirali uzročnici, te smanjila učestalost rekurentnih infekcija i multirezistentnih izolata.

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

1. Škerk V, Tambić-Andrašević A, Andrašević S, Markotić A, Škerk V. Antimikrobno liječenje i profilaksa infekcija mokraćnog sustava odraslih osoba. *Medicus* 2006; 15:251-6.
2. Sobel JD, Kaye D. Urinary Tract Infection. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Benett's (eds). *Principles & Practice of Infectious Diseases*. New York: Elsevier/Churchill Livingstone, 2005; 875-905.
3. Andrašević S, Tambić Andrašević A. Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus* 2006; 15:245-50.
4. Škerk V, Krhen I, Šterk-Kuzmanović N, Baršić B, Vicković N, Schönwald S. Otpornost uzročnika infekcija mokraćnog sustava na antimikrobna sredstva. *Pharmaca* 2001; 39:89-96.
5. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; 113:14-9.
6. Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.

7. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon, KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Antimicrob Chemother* 2001; 48:87-102.
8. Tambić-Andrašević A, Andrašević S, Škerk V. Antibiotic resistance among urinary tract pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:S91.
9. Isenberg HD, Painter BG. Comparison of conventional methods, the R/B system, and modified R/B system as guides to the major divisions of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol* 1971; 22:1126-34.
10. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-6.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing:17th *Informational Supplement* M100-S17. Wayne, PA: CLSI, 2007.
12. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-78.
13. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:908-11.
14. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, urednici. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2007; 842-55.
15. Uzunović-Kamberović S, Bedenić B, Vraneš J. Prevalence of SHV-5 β -lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:820-3.
16. 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.
17. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN, the SENTRY APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42:193-8.
18. Vraneš J, Marijan T, Bedenić B, Mlinarić-Džepina A, Katić S, Kalenić S. Clonal dissemination of highly virulent extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from the urine of non-hospitalised patients in Zagreb region. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:19-24.
19. Gupta, K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing Antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001; 135:41-50.
20. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.

Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) – Producing Enterobacteria in Outpatients from Primorsko–Goranska County, Croatia

Brigita Tićac^{1,2}, Nilia Volarević¹, Palmira Kesovija¹, Maja Farkaš¹, Dolores Peruć¹, Silvana Udovičić¹, Tomislav Rukavina^{1,3}

¹Department of Microbiology, Teaching Institute of Public Health, ²Department of Microbiology and Parasitology, Medical Faculty, University of Rijeka, ³Department of Social Medicine and Epidemiology, Medical Faculty, University of Rijeka; Rijeka, Croatia

ABSTRACT

The aim of this study was to report the prevalence of uropathogens and the frequency of extended spectrum β -lactamases (ESBL) producing strains isolated from urine of outpatients in Primorsko-Goranska County in Croatia. We have retrospectively analyzed the results of 44, 321 urine cultures from January 01, 2008 till June 30, 2009. The study showed that ESBL production was confirmed in 189 (1,8%) of the total of 10,757 isolates. Rates of ESBL-producing isolates were 19%, 0,6%, and 5.2% for *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, respectively. Geographic variations in pathogen occurrence and susceptibility profiles require continuous monitoring to provide information to guide the empiric therapeutic options.

Key words: extended spectrum β -lactamases (ESBL), uropathogens, urinary tract infections

Original submission: 10 September 2009.; **Revised version:** 04 December 2009; **Accepted:** 16 December 2009.

NOTES

Karakteristike uzročnika urinarnih infekcija povezanih s kateterima u izvanbolničkoj populaciji

Jasna Knežević¹, Neda Jarža-Davila¹, Maja Anušić¹, Ana Mlinarić-Džepina¹, Jasmina Vraneš^{1,2}

¹Služba za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, ²Katedra za bakteriologiju, virologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; Zagreb, Hrvatska

Corresponding author:

Jasna Knežević, Služba za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Mirogojska 16, 10 000 Zagreb; Phone: +385 1 469 6318; fax: +385 1 467 8006; E-mail: jasna.knezevic@stampar.hr

Originalna prijava: 14. oktobar 2009.; **Korigirana verzija:** 15. decembar 2009.; **Prihvaćeno:** 18. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):84-87

SAŽETAK

Tijekom dvije godine istraživana je prevalencija uzročnika bakterijskih infekcija mokraćnog sustava povezanih s kateterima (IMSPK) kod izvanbolničkih pacijenata, s ciljem određivanja razlika u bakterijskoj osjetljivosti na antibiotike s obzirom na spol i dob. Uzorci urina iz katetera činili su 0,3% svih obrađenih uzoraka urina. U 92,5% utvrđena je signifikantna bakteriurija, a u 63,2% polimikrobna etiologija. Većina IMSPK-a (79,3%) bila je u starijih muškaraca (>65 godina). Najčešći uropatogeni su *Escherichia coli*, ostale enterobakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i enterokoki. Enterobakterije pokazuju visoku rezistenciju prema betalaktamima, fluorokinolonima i kotrimoksazolu. Kod starijih muškaraca utvrđena je značajno viša rezistencija prema fluorokinolonima ($p < 0,01$) i kotrimoksazolu ($p < 0,05$) nego kod mlađih.

Ključne riječi: urinarni kateteri, infekcije mokraćnog sustava, antibiotska rezistencija

UVOD

Sve veći udio u populaciji čine starije osobe s pridruženim kroničnim bolestima, kao i primjenom urinarnih katetera zbog kompliciranih urogenitalnih problema, što tu skupinu čini posebno izloženu dodatnom riziku za nastanak infekcija mokraćnog sustava povezanih s kateterom (IMSPK) (1-3). Infekcije mokraćnog sustava (IMS) jedne su od najčešćih infekcija ljudi (4-6), a čak 40% svih hospitalnih infekcija otpada na IMSPK. Iako primjena sustavne antimikrobne profilakse

s kotrimoksazolom ili fluorokinolonima može smanjiti rizik nastanka IMSPK-a kod kratkotrajno kateteriziranih pacijenata, dužina trajanja kateterizacije i dalje je vodeći čimbenik njihovog nastanka (7).

Cilj ovog dvogodišnjeg istraživanja bilo je određivanje razlike u osjetljivosti bakterijskih uzročnika IMSPK-a na antibiotike s obzirom na spol i dob.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno u Zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, tijekom dvogodišnjeg perioda (2006. i 2007. godine), u Laboratoriju za urogenitalne infekcije. Ukupno 294 uzoraka urina iz katetera (UIK) obrađeno je kvantitativnom kultivacijom (zasijavanje urina kalibriranom ezom od 0,01 mL na krvni i McConkey agar (Oxoid LTD, Engleska). U istraživanje su uključeni samo oni uzorci kod kojih je utvrđena signifikantna bakteriurija (10^5 i $>10^5$ CFU/mL), dok je leukociturija (pozitivna leukocitna esteraza) ispitivana uro-test trakom.

Za interpretaciju testova osjetljivosti na antibiotike primijenjeni su kriteriji CSLI-a za disk difuzijsku metodu: amoksicilin (10 μ g), amoksicilin-klavulanska kiselina (20/10 μ g), piperacilin-tazobaktam (100/10 μ g), cefaleksin (30 μ g), cefuroksim (30 μ g), ceftibuten (30 μ g), cefiksime (5 μ g), ceftazidim (30 μ g), cefepim (30 μ g), gentamicin (10 μ g), amikacin (30 μ g), kotrimoksazol (1,25/23,75 μ g), nitrofurantoin (300 μ g), norfloksacin (10 μ g), ciprofloksacin (5 μ g) i imipenem (10 μ g). Intermedijarno osjetljivi uzročnici smatrani su osjetljivima. Istraživani uzorci podijeljeni su po dobi i spolu, u četiri grupe: muškarci <65 godina, muškarci >65 godina, žene <65 godina i žene >65 godina.

Podaci su statistički obrađeni χ^2 testom, a statistički značajna smatrana je vrijednost $p < 0,05$.

REZULTATI

Distribucija uzorka prikazana je u Tablici 1. Omjer urina iz katetera (UIK) iznosio je 2,2:1 u korist muškaraca, odnosno 79,3% u starijih bolesnika, bez obzira na spol. Bez izolata bilo je 22 UIK (11 kod muškaraca i 11 kod žena). Većina IMSPK, 172 (63,2%), bilo je polimikrobne etiologije (s dva ili tri bakterijska izolata), bez obzira na spol ili dob pacijenta, a na prvom mjestu, s obzirom na vrstu izolata, bile su enterobakterije, kako kod starijih muškaraca

Tablica 1. Distribucija bakterija po spolu i dobi

Spol	Dob (godine)	Broj izoliranih uzročnika (%)*			
		<i>E. coli</i>	GNB	NF	<i>Enterococcus sp.</i>
Muškarci	Mlađi (0-65) n=40	13 (21,3)	22 (18,6)	22 (27,5)	11 (15,1)
	Stariji (≥ 65) n=162	48 (78,7)	96 (81,4)	58 (72,5)	62 (84,9)
Ukupno		61 (100,0)	118 (100,0)	80 (100,0)	73 (100,0)
Žene	Mlađe (0-65) n=21	8 (25,0)	7 (12,1)	8 (30,8)	3 (10,3)
	Starije (≥ 65) n=71	24 (75,0)	58 (89,2)	18 (69,2)	26 (89,7)
Ukupno		32 (100,0)	65 (100,0)	26 (100,0)	29 (100,0)

**E. coli*, *Escherichia coli*; GNB, gram-negativni bacili, osim *E. coli*; NF, gram-negativni nefermentori

ca (n=179; 53,9%), tako i kod starijih žena (n=97; 63,8%). Leukociturija je utvrđena u 195 (66,3%) uzoraka.

Tablica 1 pokazuje distribuciju uzročnika po dobi i spolu. Kod starijih muškaraca s IMSPK-om, vodeće mjesto po broju izolata pripalo je enterokokima (21,5%), a od enterobakterija najčešće je izolirana *E. coli* (34,1% od svih enterobakterija, odnosno 20,3% od svih izolata u muškaraca >65 g).

Uočena je vrlo visoka rezistencija svih enterobakterija na beta-laktamske antibiotike, ali i na fluorokinolone i kotrimoksazol. Dok se rezistencija *E. coli* prema beta-laktamima i aminoglikozidima nije statistički značajno razlikovala s obzirom na dob i spol ispitanika, u skupini starijih muškaraca utvrđena je značajno viša rezistencija prema fluorokinolonima (p<0,01) i kotrimoksazolu (p<0,05) u usporedbi s mlađim muškarcima. U skupini starijih pacijenata (muškarci i žene zajedno) utvrđena je značajno viša rezistencija *E. coli* prema fluorokinolonima (p<0,05), ali ne i prema kotrimoksazolu (p>0,05).

Udio ESBL-producirajućih sojeva *E. coli* gotovo je dva puta bio veći kod starijih žena (4,1%) nego kod starijih muškaraca (2,1%), dok je zastupljenost ESBL-producirajućih sojeva *Klebsiella pneumoniae* kod starijih muškaraca 3,3 puta bila veća (41,7%) nego kod starijih žena (12,5%).

Ako multiplorezistentne sojeve definiramo kao one u kojih je prisutna rezistencija na tri ili više skupina antimikrobnih lijekova, onda je multiplorezistentnih sojeva *E. coli* bilo statistički značajno više kod starijih muškaraca (p<0,01). Kod žena je utvrđeno signifikantno više multiplorezistentnih sojeva nefermentativnih gram-negativnih štapića u mlađoj dobnoj skupini (p<0,05) (Tablica 2).

DISKUSIJA

Najveći broj naših pacijenata bilo je s područja grada Zagreba i Zagrebačke županije. Prema popisu stanovništva grada Zagreba iz 2001. godine, osoba starije dobi bilo je 115.980, a od toga 71.837 žena, što čini 61,9% (9). Podaci ovog istraživanja

pokazuju 2,2 puta češću pojavu IMSPK-a kod starijih muškaraca izvanbolničke populacije u odnosu na žene starije dobi. Za hospitalne IMSPK, Tambyah i sur. (10) navode 2,6 puta veću incidenciju kod žena, ali bez podataka o njihovoj distribuciji po dobi.

Kod starijih bolesnika tipični simptomi infekcije mokraćnog sustava (IMS) često su odsutni, a čak 20-30% osoba s ozbiljnim IMS-om nema povišenu tjelesnu temperaturu (11). Tambyah i sur. utvrdili su da se većina subjektivnih simptoma (bol, urgencija, dizurija) statistički nije razlikovala između nekateriziranih i kateteriziranih izvanbolničkih pacijenata s IMS, kao ni povišena tjelesna temperatura ili leukocitoza, koja nije prediktor IMSPK-a, posebice jer se većina tih infekcija dešava kod starijih, s već spomenutim izmijenjenim ili odsutnim simptomima (10). Kateterizirani pacijenti s IMS-om imaju signifikantni porast leukocita u urinu, u odnosu na kateterizirane pacijente bez infekcije (10), što se podudara i s leukociturijom koja je utvrđena u ovom istraživanju u 66,3% UIK-a.

Stvaranje biofilma važan je čimbenik u patogenezi IMSPK-a (12). Različiti materijali koriste se u izradi urinarnih katetera ili su oni impregnirani plemenitim metalima, ne bi li se smanjila adhezija bakterija na njihovu površinu (13). U ovom istraživanju nije analiziran utjecaj različitih vrsta urinarnih katetera koji se kod nas koriste u izvanbolničkoj populaciji na smanjenje pojave IMS-a i antibiotske rezistencije uropatogena, što će, svakako, biti predmetom jednog od slijedećih istraživanja.

Analizirajući rizične čimbenike za razvoj rezi-

Tablica 2. Distribucija multiplorezistentnih bakterija po spolu i dobi

Spol	Dob (godine)	Broj izoliranih uzročnika (%)*		
		<i>E. coli</i>	GNB	NF
Muškarci	Mlađi (0-65) n=40	1 (3,6)	6 (12,5)	8 (42,1)
	Stariji (≥ 65) n=162	27 (96,4)	42 (87,5)	11 (57,9)
Ukupno		28	48	19
Žene	Mlađe (0-65) n=21	6 (35,3)	1 (4,5)	4 (80,0)
	Starije (≥ 65) n=71	11 (64,7)	21 (95,5)	1 (20,0)
Ukupno		17	22	5

**E. coli*, *Escherichia coli*; GNB, gram-negativni bacili, osim *E. coli*; NF, gram-negativni nefermentori

stencije *E. coli* prema ciprofloksacinu kod izvanbolničkih pacijenata s IMS-om, Arslan i sur. (5) utvrdili su da muški spol, prisutnost katetera i uzimanje ciprofloksacina više od jednog puta tijekom zadnje godine, pokazuje signifikantnu povezanost s rezistencijom prema ciprofloksacinu. U ovom istraživanju *E. coli* je pokazala statistički značajno višu rezistenciju prema fluorokinolonima u starijih pacijenata bez obzira na spol. Kao rizik nastanka rezistencije *E. coli* prema fluorokinolonima u hospitaliziranih pacijenata s IMS-om, navodi se starija dob (>65 godina) i prethodna infekcija mokraćnog sustava (14), a Lin i sur. rizik razvoja rezistencije u *E. coli* prema ciprofloksacinu povezuju s upotrebom kinolona unutar dva tjedna od uzorkovanja urina i kateterom u mokraćnom sustavu na dan uzorkovanja urina (15).

Analize prethodne potrošnje antibiotika i ostalih faktora rizika za razvoj rezistentnih sojeva *E. coli* kod izvanbolničke populacije pacijenata s IMS-om pokazale su da je prethodna kateterizacija ili operacija mokraćnog mjehura, te vrijeme trajanja terapije trimetoprimom dužim od sedam dana, povezano s rezistencijom *E. coli* prema trimetoprimu koji je dan kao monoterapija (16). Za kotrimoksazol-rezistentnu *E. coli* u hospitaliziranih nađena su tri rizična čimbenika - muški spol, produljena hospitalizacija i prethodna infekcija mokraćnog sustava - dok prethodna terapija kotrimoksazolom nije imala signifikantnog utjecaja na pojavu rezistentnih sojeva (14).

Prema hrvatskim nacionalnim smjernicama antimikrobnog liječenja, bolesnike s urinarnim kateterom za dugotrajnu upotrebu i asimptomatskom bakteriurijom, ne treba liječiti antibioticima, već samo one simptomatske. Za simptomatske IMSPK, kao i IMS kod muškaraca, koji su razvrstani u kategoriju kompliciranih IMS, prvi izbor u ambulantnom liječenju jeste ciprofloksacin, alternativno koamoksiklav, cefalosporini II i III generacije (6). Liječenje se bazira na antibioticima odabranim prema testovima osjetljivosti uz izmjenu katetera.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je rezistencija uzročnika IMSPK-a, kod izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije, na preporučene antibiotike vrlo visoka, posebice kod starijih muškaraca, a činjenica da ove multiplorezistentne bakterije na površini katetera stvaraju polimikrobni biofilm, što dodatno doprinosi rezistenci-

ji, razlog je neophodnosti odstranjenja katetera u slučaju infekcije.

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

- Hazelett SE, Tsai M, Gareri M, Allen K. The association between indwelling urinary catheter use in the elderly and urinary tract infection in acute care. *BMC Geriatrics* 2006; 6:15.
- Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Penges DA and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. CDC. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_catheter_assoc.html (13.12.2009)
- Kang SC, Hsu NW, Tang GJ, Hwang SJ. Impact of urinary catheterization on geriatric inpatients with community-acquired urinary tract infection. *J Chin Med Assoc* 2007; 70:236-40.
- Marijan T, Mlinarić-Džepina A, Vraneš J, Leskovar V, Knežević J, Matica B. Odlike infekcija mokraćnog sustava kod starijih izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije. *Med Glas* 2007; 4:8-13.
- Arslan H, Azap OK, Ergonul O, Timurkaynak F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:914-8.
- Škerk V, Tambić Andrašević A, Andrašević S, Sušić E, Mlinarić Džepina A, Mađarić V, Milutinović S, Krhen I, Perić Lj, Bagatin J, Čorić M, Ferlin D, Cazin I, Tomac G. ISKRA smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava - hrvatske nacionalne smjernice. *Liječ Vjesn* 2004; 131:105-18.
- Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:342-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement M100- S16. CLSI, Wayne, PA, 2006.
- Popis 2001. Stanovništvo grada Zagreba - prema dobnoj i spolnoj strukturi; ISBN 953-6558-10-6, Zagreb: Gradski zavod za prostorno uređenje Zagreb, 2005. <http://www1.zagreb.hr/zgstat/documents/stanovnistvo>
- Tambyah PA, Maki DG. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic. 2000. <http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/full/160/5/678>.
- Yoshikawa TT. Antimicrobial resistance and Aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc* 2002; 50:226-9.
- Vraneš J, Leskovar V. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas* 2009; 6:147-65.
- Esposito S, Noviello S, Leone S. Le infezioni urinarie associate a catetere: epidemiologia e prevenzione. *Le infezioni in medicina* 2008; 3:130-43.
- Sotto A, de Boever CM, Fabbro-Peray P, Gouby A, Siroton D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *J Clin Mi-*

- crobiol 2001; 39:438-44.
15. Lin CY, Huang SH, Chen TC, Lu PL, Lin WR, Chen JH. Risk factors of ciprofloxacin resistance in urinary *Escherichia coli* isolates. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41:325-31.
 16. Hillier S, Roberts Z, Dunstan F, Butler C, Howard A, Palmer S. Prior antibiotics and risk of antibiotic-resistant community-acquired urinary tract infection: a case-control study. J Antimicrob Chemother 2007; 60:92-9.

Characteristics of uropathogens in out-patient catheter-associated urinary tract infections

Jasna Knežević¹, Neda Jarža-Davila¹, Maja Anušić¹, Ana Mlinarić-Džepina¹, Jasmina Vraneš^{1,2}

¹Institute of Public Health „Dr. Andrija Štampar“, Department of Microbiology, ² University of Zagreb, School of Medicine, Department of bacteriology, virology and parasitology; Zagreb, Croatia

ABSTRACT

During the two years period the prevalence of uropathogens responsible for catheter-associated urinary tract infection (CAUTI) in outpatients was investigated including their differences in antimicrobial susceptibility according to the age and gender. Indwelling urinary catheter (IUC) constitutes 0.3% of all processed urine samples. Significant bacteriuria was found in 92.5% of IUC, and polymicrobial etiology in 63.2%. The most CAUTI (79.3%) was found in elderly male patients (>65 years). The most frequently isolated uropathogens were *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and enterococci. The very high resistance of all *Enterobacteriaceae* to beta-lactams, fluoroquinolones, and co-trimoxazole was observed with significantly much higher fluoroquinolone ($p<0.01$) and co-trimoxazole ($p<0.05$) resistance in elderly male patients as compared with younger ones.

Key words: urinary catheters, urinary tract infections, antibiotic resistance

Original submission: 14 October 2009.; **Revised version:** 15 December 2009; **Accepted:** 18 December 2009.

NOTES

Lokalno liječenje vaginalne infekcije s kombinacijom nifuratela i nistatina

Mahira Jahić¹, Adem Balić¹, Mahmud Nurkić², Jasmina Dragović¹, Amela Adžajić¹, Amra Habibović, Lejla Mešalić, Aza Žigić

¹Služba za zdravstvenu zaštitu žena, ²Zavod za medicinsku dijagnostiku; Dom zdravlja Tuzla s poliklinikom ž' Dr. Mustafa Šehović"; Tuzla, Bosna i Hercegovina

Corresponding author:

Mahira Jahić,
Služba za zdravstvenu zaštitu žena, Dom zdravlja Tuzla s poliklinikom "Dr. Mustafa Šehović", 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina; Phone: +387 35 225 223; fax: +387 35 225 223
E-mail: mahira.j@bih.net.ba

Originalna prijava: 06. juli 2009.; **Korigovana verzija:** 16. decembar 2009.; **Prihvaćeno:** 22. decembar 2009.

Med Glas 2010; 7(1):88-90

SAŽETAK

Prospektivnom studijom analizirano je 40 pacijentica s kliničkim znacima kolpitisa i mikrobiološki izolovanim uzročnicima, kod kojih je primijenjena šestodnevna terapija vaginalnim tabletama nifuratel 500 mg i nistatin 200 000 i.j., a nakon koje je ponovljen pregled vaginalnih i cervikalnih briseva. Analizom vaginalnog sekreta mikrobiološkim putem pronađena je bakterijska flora kod 34 (65%) ispitanica, gljivična kod 15 (24%), te *Trichomonas vaginalis* u 7 (11%) pacijentica. Lokalna vaginalna terapija, kombinacija nifuratela i nistatina, kod trihomonadnih kolpitisisa dovela je do izliječenja kod svih 7 slučajeva, kod gljivičnih u 14 (93%), a kolpitisisa uzrokovanog bakterijama kod 29 (71%) pacijentica.

Gljučne riječi: kolpitis, kombinacija nifuratel-nistatin, lokalna terapija

UVOD

Vodeći problem žena u reproduktivnom periodu jesu infekcije vagine i cerviksa. Samo u SAD-u, svake godine, više od 10 miliona žena zatraži pomoć ginekologa radi vaginalne infekcije (1). Oko 50% infekcija izazvano je bakterijama, a gljivama i protozoama po 25% (2). Liječenje vaginitisa i cervicitisa u principu se započinje na osnovu postojanja kliničkih znakova upalnih promjena vagine i cerviksa, antibioticima širokog spektra (2), a ukoliko njihova upotreba ne ukloni znakove upale, radi se vaginalni i cervikalni bris, te mikrobiološki utvrđuje uzročnik i antibiogram. Kombinacija 500 mg nifuratela i 200 000 i.j. nistatina u

obliku vaginaleta, čini se opravdana za liječenje većeg broja kolpitisu budući da aktivne komponente ovog lijeka obezbjeđuju širok spektar dejstva koji zahvata bakterije, gljive i protozoe (3). S obzirom da su, prema našem kliničkom iskustvu, infekcije vagine najčešće miješanog tipa, uzrokovane bakterijama udruženim s *Trichomonas vaginalis* i gljivama, a uobičajena terapija koja se primjenjuje jeste kombinacija metronidazola s antibiotikom, željeli smo ispitati efikasnost šestodnevne vaginalne terapije preparatom koji sadrži nifuratel i nistatin.

MATERIJAL I METODE

U Službi za zdravstvenu zaštitu žena JZU Dom zdravlja s poliklinikom „Dr. Mustafa Šehović” u Tuzli, u periodu 01. 01. do 30. 04. 2009. godine, analiziran je vaginalni sekret (nativni mikroskopski pregled), te vaginalni i cervikalni bris (mikrobiološki pregled, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku) svih pacijentica s kliničkim znacima kolpitisu - pojačanom vaginalnom sekrecijom, bolom u dnu stomaka i bolnim spolnim odnosima.

Vaginalne tablete nifuratel (500 mg) i nistatin (200 000 i.j.) uključene su kod pacijentica s kliničkim i mikrobiološkim znacima bakterijskog, gljivičnog i trihomonadnog kolpitisu. Primijenjena je šestodnevna terapija, po jedna vaginalna tableta uveče, nakon koje je ponovljen nalaz vaginalnog sekreta, bakteriološki pregled vaginalnih i cervikalnih briseva, te ginekološki pregled. Statistička analiza značajnosti razlika učinjena je χ^2 testom, a vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Od strane etičkog komiteta naše Ustanove odobreno je sprovođenje ovog istraživanja.

REZULTATI

U periodu od 01. 01. do 30. 04. 2009. godine, ispitano je 40 pacijentica starosne dobi od 20 do 40 godina (prosjeak $31,4 \pm 1,1$ godina) s kliničkim znacima kolpitisu.

Tabela 1. Mikroorganizmi izolovani mikrobiološkim putem kod ispitanica s kolpitisom, prije i nakon lokalne vaginalne terapije kombinacijom nifuratela i nistatina

Mikroorganizmi	Prije terapije	Poslije terapije	(% izliječenja)
Enterococcus species	18	5	(72)
Escherichia coli	7	4	(43)
Streptococcus beta haemolyticus	5	1	(80)
Staphylococcus aureus	5	0	(100)
Klebsiella pneumoniae	3	0	(100)
Proteus mirabilis	5	5	(0)

Bolnu osjetljivost grlića, u toku ginekološkog pregleda, imala je 21 (52,5%) ispitanica. Svih 40 pacijentica imalo je pojačanu vaginalnu sekreciju, a kod 14 (35%) pacijentica to je bio jedini simptom; bol u dnu stomaka, uz pojačanu vaginalnu sekreciju, imalo je 19 (47%), dok je tri udružena simptoma (pojačana vaginalna sekrecija, bol u dnu stomaka i bolni spolni odnosi) imalo 7 (18%) pacijentica. Boja vaginalnog sekreta najčešće je bila siva kod 16 (40%), a najrjeđe zelena kod 4 (10%) ispitanice. Analizom vaginalnog sekreta najčešće je pronađena bakterijska flora (najčešće *Enterococcus* sp. i *E. coli*) kod 34 (65%) ispitanice, gljivična (*Candida albicans*) kod 15 (24%), te *Trichomonas vaginalis* kod 7 (11%) ispitanica. Nakon provedene lokalne vaginalne terapije nifuratelom i nistatinom, došlo je do smanjenja subjektivnih smetnji - pojačanu vaginalnu sekreciju, nakon terapije, imalo je samo 5 (12%), a bolove u dnu stomaka 6 (15%) pacijentica. Lokalna vaginalna terapija nifuratelom i nistatinom, primijenjena kod trihomonadnih kolpitisu, dovela je do izliječenja svih 7 (100%) pacijentica, kod kolpitisu uzrokovano gljivama došlo do izliječenja 14 (93%) od 15 ispitanica, a kod kolpitisu izazvanog bakterijama izliječeno je 28 (71%) pacijentica ($p < 0,05$).

DISKUSIJA

Pojačana vaginalna sekrecija pronađena je kod svih 40 (100%) pacijentica sa znacima kolpitisu, što je u skladu s do sada objavljenim rezultatima drugih autora (4). Trihomonadna infekcija javlja se kod 10% do 25% slučajeva vaginitisa i često je udružena s drugim seksualno prenosivim bolestima, gljivične infekcije u kombinaciji s aerobnim vaginitisom i anaerobnom vaginozom u oko 30% slučajeva, a u 15% uzrok infekcije su samo gljive (6). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su uzročnici kolpitisu najčešće bile bakterije, potom gljive, dok je trihomonadni vaginitis bio zastupljen nešto rjeđe.

Lokalna vaginalna terapija, kombinacijom nifuratela i nistatina, primijenjena kod naših pacijentica kod kolpitisu uzrokovano *Trichomonas vaginalis* i onog uzrokovano gljivama, dovela je do izliječenja u svim slučajevima, u odnosu na slučajeve kolpitisu uzrokovane bakterijama (71%) ($p < 0,05$). Slično ispitivanje s vaginaletama izveo je Zlatkov (1998.) u Bugarskoj, ispitujući 52 žene koje nisu bile trudne, te ustanovio, nakon 7-10-dnevnog liječenja nifuratel-nistatin vaginaletama, reduk-

ciju bakterijske vaginoze kod 84% i kandidijaze kod 69% slučajeva (7). Široka klinička upotreba nifuratela pokazuje da je lijek siguran i efikasan za tretman trihomonijaze, bakterijske vaginoze, kandidijaze i djelimično kod pacijenata kod kojih je nađena miješana bakterijska flora. Meta-analizom utvrđena je daleko veća efikasnost nifuratela od metronidazola kod pacijenata s miješanom infekcijom, kod kandidijaze i trihomonijaze (8). Naša studija je pokazala da je upotreba lokalne vaginalne terapije nifuratelom i nistatinom efikasna kod kolpitis koji su izazvani s *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, dok je djelimično efikasna kod miješane bakterijske flore. Međutim, veoma bitan učinak terapije nifuratelom i nistatinom kod naših pacijentica, bila je eliminacija *Enterococcus* species i *E. coli* u visokom procentu (72%-43%), a za koje je poznato da imaju veoma visok stepen rezistencije na antibiotike (9). Neželjena dejstva ovog lijeka opisuju se kao veoma rijetka, kako zbog lokalne primjene, tako i zbog osobina samog lijeka, te stoga predstavlja dobar izbor za liječenje većine vaginalnih infekcija.

U ovom istraživanju nije ispitivana primjena lijeka kod žena s bakterijskom vaginozom (*Gardneria vaginalis*) i infekcije uzrokovane i anaerobnim bakterijama, što će, svakako, biti predmet narednog istraživanja.

Šestodnevna vaginalna terapija, s kombinacijom nifuratela i nistatina, terapija je izbora u liječenju miješanih vaginalnih infekcija, s posebno značajnim dejstvom na infekcije uzrokovane *Trichomonas vaginalis* i gljivama.

ZAHVALE/IZJAVE

Komercijalni ili potencijalni dvostruki interes ne postoji.

LITERATURA

1. Sweet R. The Vaginitis Report. Volume One. Saint Paul: National Vaginitis Association, 3M Center, 1998.
2. Kesić V. Kolposkopija i bolesti donjeg genitalnog sistema žene. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2000.
3. Georgijević A, Cjukic I, Bujko M. Bacterial vaginosis. Epidemiology and risk factor. Srp Arh Celok Lek 2000; 128:22-3.
4. Geisler WM, Yu S, Venglarik M, Schwebke JR. Vaginal leucocyte counts in women with bacterial vaginosis: relation to vaginal and cervical infections. Sex Transm Infect 2004; 80:401-5.
5. Jahić M. Kliničke, mikrobiološke i citološke karakteristike enterokoknog vaginitisa. Doktorska disertacija. Tuzla: Medicinski fakultet Univerzitet u Tuzli, 2007.

6. Cepicky P, Malina J, Libalova Z, Kuzelova M. Mixed and miscellaneous vulvovaginitis: diagnostic and therapy of vaginal administration of nystatin and nifuratel. Ceska Gynecol 2005; 70:232-7.
7. Zlatkov V, Karagozov I. The treatment of vaginal infections with Macmiror and Macmiror complex. Akush Ginekol Sofia; 1998; 37:57-9.
8. Mendling W, Poli A, Magnani P. Clinical effects of nifuratel in vulvovaginal infections: a meta-analysis of metronidasole-controlled trials. Arzneimittelforschung 2002; 52:725-30.
9. Aleksandrovic J. Drug resistance of *Enterococcus* species from the urogenital system. Med Dosw Mikrobiol 1999; 51(3-4):233-8.

Local join therapy of vaginal infections by nifuratel-nistatin

Mahira Jahić¹, Adem Balić¹, Mahmud Nurkić², Jasmina Dragović¹, Amela Adžajlić¹, Amra Habibović, Lejla Mešalić, Aza Žigić

¹Department for Health Care of Women, ²Department of Medical Diagnostic; Health Center Tuzla, "Dr Mustafa Šehović" Tuzla B&H

ABSTRACT

A test included 40 women in the reproductive age with clinical symptoms of vaginitis and microbiological examination. They were treated by combined therapy of vaginal tablets of nifuratel, 500 mg and nistatin 200 000 i. u. during six days, after which they underwent gynaecological reexamination and repeated microbiological examination of vaginal and cervical smears. An analysis of vaginal secretion found bacterial flora in 34 smears (65%), fungus (*Candida albicans*) in 15 (24%) and *Trichomonas vaginalis* in 7 (11%). Local vaginal therapy in vaginitis caused by *Trichomonas vaginalis* was successful in all 7 patients, vaginitis caused by *Candida albicans* was successfully treated in 14 (93%) patients. Bacterial vaginitis was cured in 29 (71%) patients during this therapy. Local vaginal combined therapy of nifuratel and nistatin is efficient in patients with vaginitis caused by fungi and *Trichomonas vaginalis* too.

Key words vaginitis, nifuratel nistatin, local therapy

Original submission: 06 July; **Revised submission:** 16 December 2009; **Accepted:** 09 December 2009.

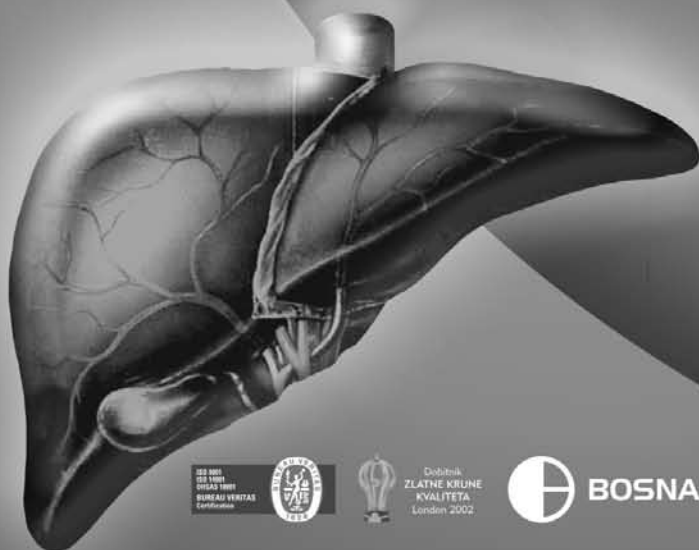
Hepalip forte®

kapsule

Za obnovu jetre i poboljšanje njene funkcije

Kombinacija esencijalnih fosfolipida i
vitamina (B1, B2, B6, PP i E) u
Hepalip forte kapsulama:

- efikasno obnavlja i štiti jetrene
ćelije
- zaustavlja daljnje napredovanje
oštećenja jetre
- značajno poboljšava opšte
stanje pacijenta uz izuzetno
dobru podnošljivost



ISO 9001
ISO 14001
DIN EN ISO 9001
DIN EN ISO 14001
PURE AU VERITAS
Certification



Dobitnik
ZLATNE KRUNE
KVALITETA
London 2002



BOSNALIJEK






tablete 20 mg+12,5 mg

tablete 10 mg+12,5 mg






LOPRIL® H

lizinopril i hidrohloriazid

-  Savršen sinergizam ACE inhibitora i diuretika
-  Povećanje antihipertenzivne efikasnosti uz smanjenje neželjenih efekata
-  Visoko djelotvorna terapija hipertenzije i u slučaju kada se monoterapijom ne postiže regulacija krvnog pritiska
-  Sve prednosti u jednoj prepoznatljivoj tableti
-  Samo jedna dnevno



-  **LOPRIL H** je indiciran kod hipertenzije različite etiologije koja zahtijeva kombiniranu terapiju sa diuretikom.
-  Liječenje se započinje manjom dnevnom dozom od 5 do 10 mg, a nakon postizanja zadovoljavajućeg efekta odredi se jednokratni tretman, 1 tableta od 10 ili 20 mg. U renalnoj insuficijenciji ili renovaskularnoj hipertenziji doze počinju sa 2,5 do 5,0 mg **LOPRILA H** na dan.
-  Djelotvornost i podnošljivost **LOPRILA H** je identična u starijih i mlađih odraslih bolesnika. Prisustvo hrane ne mijenja bitno apsorpciju lizinopрила.



Dobitnik
ZLATNE KRUNE
KVALITETA
London 2002



BOSNALIJEK

Nekada
AVAMIGRAN®
a sada...

NOMIGREN®



Nomigren® prekida i prevenira napad kod:

- Klasične (vaskularne) migrene
- Migrene varians
- KomPLICIRANE migrene
- Histaminske cefalgije
- Cluster glavobolje

Dokazana efikasnost u prevenciji i liječenju +
Odlična podnošljivost + Jednostavna primjena

Nekada Avamigran®
→ potpuno identičnog
sastava aktivnih komponenti
→ u istom farmaceutskom obliku

OD SADA POD NOVIM IMENOM

NOMIGREN®

ISO 9001
ISO 14001
OHSAS 18001
BUREAU VERITAS
Certification



Dobitnik
ZLATNE KRUNE
KVALITETA
London 2002



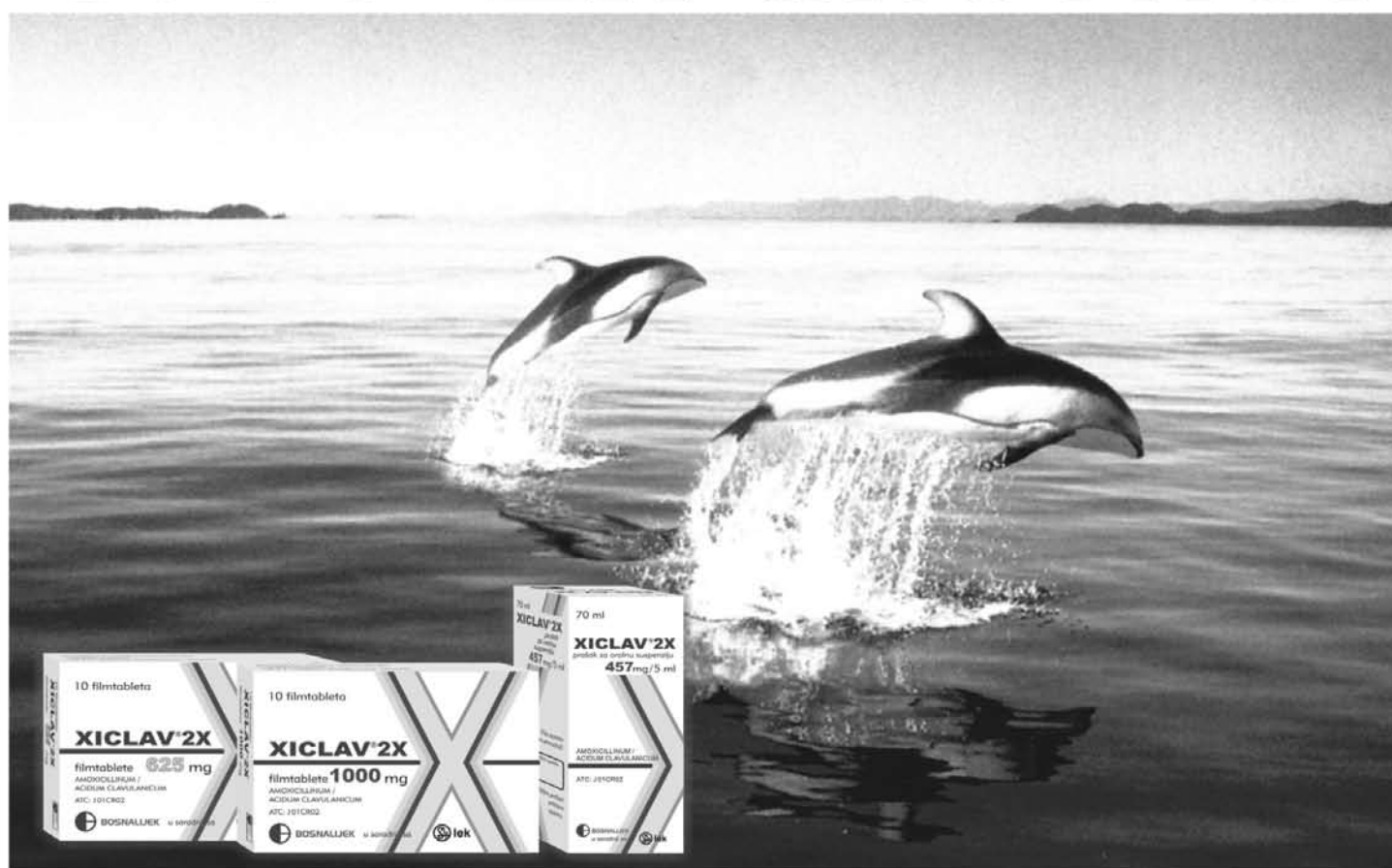
BOSNALIJEK

filmtbl. 625 mg
filmtbl. 1000 mg
susp. 457 mg/5 mL

Xiclav[®] 2X

Amoksicilin/Klavulanska kiselina

sada 2x dnevno!



Jednako djelotvoran i efikasan kao oblik 3x/dan

Jednostavno doziranje 2x dnevno

Prijatna voćna aroma suspenzije

Manje neželjenih GI efekata

ISO 9001
ISO 14001
DIN EN ISO 13485
BUREAU VERITAS
Certification



Dobitnik
ZLATNE KRUNE
KVALITETA
London 2002



BOSNALIJEK
u saradnji sa



Golderm®

sukralfat vlažni gel 25%

Obnavlja oštećenu kožu i sprječava nastanak ožiljaka

NOVO

REVOLUCIJA!



Prije upotrebe pažljivo pročitat! Pročitajte uputstvo. Za sve dodatne informacije posjetite sa našim ljekarni ili apotekaru.

Čuvati
Vašeg zdravlja

BRZO ZACJELJIVANJE OŠTEĆENE KOŽE I EFIKASNO SPRJEČAVANJE NASTANKA OŽILJAKA KOD:

- ogrebotina • posjekotina • drugih neinficiranih rana • opekotina
- raspuknuća kože • čireva na nogama • dijabetičkih čireva
- dekubitusa (rana na koži koje nastaju usljed dugog ležanja)



U svim apotekama bez ljekarskog recepta!

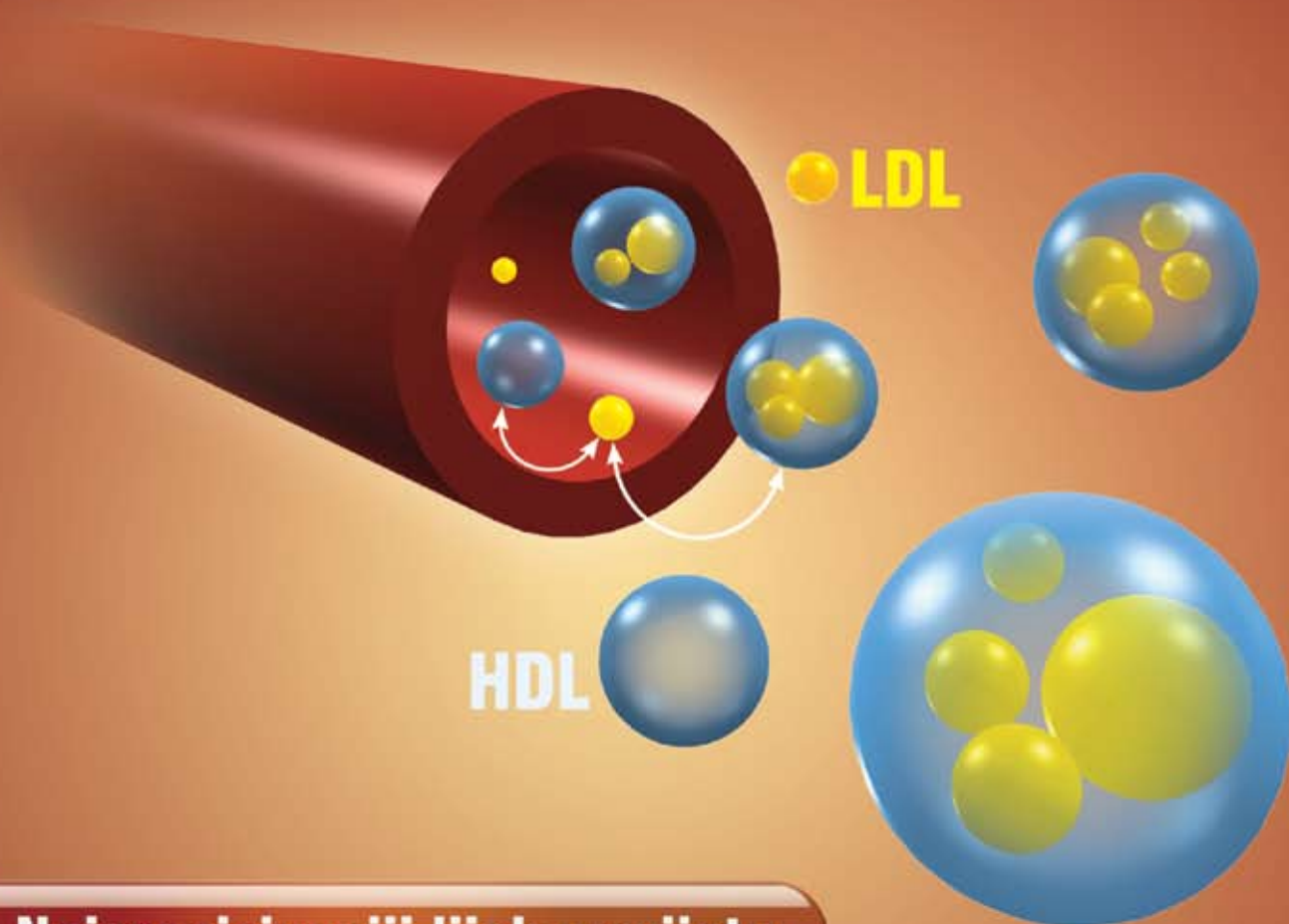


TOZAR[®] atorvastatin

filmtablete 10 mg i 20 mg

HIPOLIPEMIK

NOVO



**Najpropisivaniji lijek u svijetu
za snižavanje povišenih masnoća u krvi**



cardio
BOSNALIJEK



BOSNALIJEK

Pakovanje:

Kutija s 30 filmtableta 10 mg
Kutija s 30 filmtableta 20 mg