

Širenje gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije između bakterija bolničkih otpadnih voda

Gulan, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:852816>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Petra Gulan

**ŠIRENJE GENA ZA REZISTENCIJU
NA CEFALOSPORINE 3. GENERACIJE
IZMEĐU BAKTERIJA BOLNIČKIH
OTPADNIH VODA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za okolišnu mikrobiologiju i biotehnologiju na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod komentorstvom znanstvene savjetnice dr. sc. Nikoline Udiković Kolić te uz pomoć dr. sc. Svjetlane Dekić Rožman i Ane Puljko, mag. ing. agr.

Diplomski rad *Širenje gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije između bakterija bolničkih otpadnih voda* napravljen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom "Antibiotska rezistencija u uređajima za obradu otpadnih voda u Hrvatskoj: naglasak na β -laktamaze proširenog spektra i karbapenemaze (WasteCare)", IP-2019-04-5539, voditeljice projekta dr. sc. Nikoline Udiković Kolić.

Zahvaljujem se svojim mentoricama prof. dr. sc. Jasni Novak i dr. sc. Nikolini Udiković Kolić na pruženom vodstvu te izdvojenom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Svjetlani Dekić Rožman i Ani Puljko, mag. ing. agr., na pomoći i pruženom znanju, kao i na ugodno provedenom vremenu u laboratoriju.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, a najviše Ani, mojoj vjernoj suputnici kroz sve lijepo i manje lijepo zadnjih 15 godina.

I na kraju mojoj obitelji, najčvršćem osloncu i najsigurnijoj luci. Hvala vam na beskonačnoj količini podrške i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ŠIRENJE GENA ZA REZISTENCIJU NA ĆEFALOSPORINE 3. GENERACIJE IZMEĀU BAKTERIJA BOLNIĀKIH OTPADNIH VODA

Petra Gulan, univ. bacc. ing. biotechn.
0058210658

Sažetak: Antibiotička rezistencija predstavlja ozbiljan globalni problem zbog ograničenog izbora antibiotika za lijećenje bakterijskih infekcija. Plazmidi su presudne genetičke determinante za širenje antibiotičke rezistencije. Upravo u ovom radu analiziran je plazmidni prijenos gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije iz bakterija bolničkih otpadnih voda u *Escherichia coli* CV601. Egzogenom izolacijom plazmida dobiveno je 11 transkonjuganata s višestruko rezistentnim fenotipom, potvrđenim metodama disk difuzije i mikrodilucije. PCR analizom ustanovljeno je da plazmidi transkonjuganata sadrže minimalno jedan gen za β-laktamazu proširenog spektra (ESBL) pri čemu prevladava *bla_{CTX-M-1}*. Uz ESBL gen(e), na 3 plazmida detektirana je prisutnost gena za karbapenemazu *bla_{VIM}*. Na temelju PBRT analize plazmidi su svrstani u 4 skupine inkompatibilnosti pri čemu je dominirala IncL/M skupina. Budući da plazmidi ove skupine imaju širok raspon bakterijskih domaćina i nose višestruku rezistenciju, postoji rizik da upravo bolničke otpadne vode predstavljaju izvor i put daljnjeg širenja višestruko rezistentnih ESBL-producirajućih bakterija, uključujući patogene.

Gljučne riječi: *antibiotička rezistencija, BOX-PCR, egzogena izolacija plazmida, ESBL i karbapenemazni geni, PBRT analiza*

Rad sadrži: 52 stranice, 17 slika, 9 tablica, 88 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Komentor: dr. sc. Nikolina Udiković Kolić, znan. savj., Institut Ruđer Bošković

Pomoć pri izradi: dr. sc. Svjetlana Dekić Rožman i Ana Puljko, mag. ing. agr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Tonči Rezić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. dr. sc. Nikolina Udiković Kolić, znan. savj., IRB (ćlan)
4. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (zamjenski ćlan)

Datum obrane: 15. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Probiotic and Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

SPREADING OF THE 3RD GENERATION CEPHALOSPORINS RESISTANCE GENES AMONG BACTERIA OF HOSPITAL WASTEWATER

Petra Gulan, univ. bacc. ing. biotechn.
0058210658

Abstract: Antibiotic resistance presents a serious public health issue, due to reduced effective therapeutic approaches for the treatment of bacterial infections. Plasmids are key genetic determinants for the spread of antibiotic resistance. In this work, the plasmid transfer of genes from hospital wastewater bacteria resistant towards 3rd generation cephalosporins into *Escherichia coli* CV601 was analyzed. 11 transconjugants with a multiple resistance phenotype were obtained by exogenous isolation of the plasmid, which were confirmed by BOX-PCR. PCR analysis revealed that the plasmids of the transconjugants contain at least one extended-spectrum β -lactamase (ESBL) gene, with the highest frequency of *bla*_{CTX-M-1}. Additionally, the carbapenemase genes (*bla*_{VIM}), were detected on 3 plasmids. Based on PBRT analysis, plasmids were grouped into 4 groups of incompatibility with the IncL/M group prevailing. Since the plasmids of this group have a range of bacterial hosts and carry multiple resistances there is a risk that hospital wastewater can be a source of multiple resistant bacteria, including pathogens, and thus the risk of further spreading into the environment.

Keywords: *antibiotic resistance, BOX-PCR, exogenous plasmid isolation, ESBL and carbapenemase genes, PBRT analysis*

Thesis contains: 52 pages, 17 figures, 9 tables, 88 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasna Novak PhD, Full professor

Co-mentor: Nikolina Udiković Kolić PhD, Scientific Adviser

Technical support and assistance: Svjetlana Dekić Rožman PhD and Ana Puljko mag. ing. agr.

Reviewers:

1. Tonči Rezić, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Nikolina Udiković Kolić, PhD, Scientific Adviser (member)
4. Ana Bielen, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 15th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. β-LAKTAMSKI ANTIBIOTICI	3
2.1.1. Struktura i mehanizam djelovanja.....	3
2.1.2. Cefalosporini 3. generacije	4
2.1.3. Karbapenemi	5
2.2. REZISTENCIJA BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE	6
2.2.1. Mehanizmi rezistencije na cefalosporine 3. generacije.....	8
2.2.2. Vrste ESBL enzima.....	8
2.2.3. Ostale ESBL.....	9
2.2.4. Karbapenemaze	10
2.3. OTPADNE VODE KAO MEDIJ ZA ŠIRENJE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE ..	12
2.4. ULOGA PLAZMIDA U ŠIRENJU REZISTENCIJE NA CEFALOSPORINE 3. GENERACIJE	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. POPIS MATERIJALA	14
3.1.1. Uzorci otpadne vode i recipijentne bakterije	14
3.1.2. Antibiotici	14
3.1.3. Hranjive podloge i otopine.....	15
3.2. EGZOGENA IZOLACIJA PLAZMIDA KOJI NOSE GENE ZA REZISTENCIJU NA CEFOTAKSIM	17
3.2.1. Transkonjugacija.....	17
3.2.2. Nacjepljivanje na selektivne podloge.....	18
3.2.3. Selekcija i pročišćavanje potencijalnih transkonjuganata.....	20
3.3. DETEKCIJA POZITIVNIH TRANSKONJUGANATA POMOĆU METODE BOX-PCR	22
3.4. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI TRANSKONJUGANATA NA ANTIBIOTIKE	23
3.4.1. Testiranje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom disk difuzije	23
3.4.2. Testiranje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom mikrodilucije	24
3.5. IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA	25
3.6. DETEKCIJA ESBL GENA POMOĆU METODA PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE	25
3.7. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE POMOĆU METODA PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE	27
3.8. ODREĐIVANJE SKUPINE INKOMPATIBILNOSTI PLAZMIDA PCR METODOM ZA IDENTIFIKACIJU REPLIKONA	28

4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. DETEKCIJA MOBILNIH PLAZMIDA KOJI NOSE ESBL GENE	31
4.2. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI TRANSKONJUGANATA NA ANTIBIOTIKE.....	33
4.3. DETEKCIJA ESBL GENA I GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE NA PLAZMIDIMA	38
4.4. KLASIFIKACIJA PLAZMIDA PREMA SKUPINAMA INKOMPATIBILNOSTI.....	40
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Najbolji primjer kako u znanstvenom istraživanju ponekad glavnu ulogu ima puka slučajnost je Alexander Fleming i otkriće prvog antibiotika, penicilina. Kada je 1928. godine Fleming opazio kako kontaminacija kolonijama plijesni inhibira rast bakterije *Staphylococcus aureus*, nije mogao ni naslutiti da će pokrenuti globalnu revoluciju u medicini koja će spasiti nebrojeno života. U razdoblju između četrdesetih i šezdesetih godina prošlog stoljeća otkrivena je većina antibiotika koja je i danas u primjeni pa se taj period smatra zlatnom erom antibiotika. S otkrićem novih molekula antibiotika značajno je smanjena smrtnost od bakterijskih infekcija. Međutim, tu zlatnu eru prekinula je pojava sojeva rezistentnih na antibiotike. Bakterije, iako prosječnog genoma veličine od samo 5 Mb, imaju iznimnu sposobnost adaptacije okolišu u kojem žive uslijed promjena nasljednog materijala. Neracionalnim i neodgovornim korištenjem antibiotika kontinuirano se selekcioniра јединке koje su razvile određeni oblik rezistencije. Iz jedne rezistentne bakterijske stanice vertikalnim prijenosom genetičkog materijala ta se rezistencija prenosi na stanice kćeri, a horizontalnim prijenosom putem plazmida geni za rezistenciju dodatno se šire kroz populaciju. Pažnja koja je do početka 21. stoljeća bila usmjerena na širenje rezistentnih Gram-pozitivnih bakterija (meticilin-rezistentnih stafilokoka i vankomicin-rezistentnih enterokoka) (Nicasio i sur., 2008) preusmjerena je na Gram-negativne bakterije rezistentne na β -laktame. β -laktamski antibiotici su najčešće korišteni antibiotici u liječenju bakterijskih infekcija zbog niske toksičnosti, velike djelotvornosti i širokog spektra djelovanja, ali njihovo učestalo korištenje rezultiralo je selekcijom i širenjem bakterija rezistentnih na sve podskupine ovih antibiotika. Posebice zabrinjava sve veći porast rezistencije na cefalosporine 3. generacije koji su iznimno djelotvorni antibiotici za liječenje infekcija uzrokovanim Gram-negativnim bakterijama (Paladino i sur., 2008). U pozadini ove rezistencije leži proizvodnja enzima β -laktamaza proširenoga spektra djelovanja (engl. „*extended spectrum β -lactamase*“, ESBL) koje hidroliziraju sve generacije cefalosporina, monobaktame i peniciline te dovode do rezistencije (Colodner, 2005). Za liječenje infekcija uzrokovanim ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama, obično se primjenjuju karbapenemi, vrlo moćna podskupina β -laktama, kao zadnja terapijska opcija. No s porastom njihove uporabe došlo je do razvoja rezistencije koja je najčešće posredovana enzimima karbapenemazama i samim time gubitka djelotvornosti tih dragocjenih lijekova. Zabrinjavajuća činjenica je da su geni za ESBL i karbapenemaze uglavnom smješteni na mobilnim genetičkim elementima - plazmidima, zbog čega je uvelike olakšano njihovo horizontalno širenje među istim ili različitim vrstama. Većina istraživanja

koja se bave problematikom plazmidnog prijenosa gena za antibiotsku rezistenciju usmjerena je na kliničke izolate, dok su spoznaje o širenju rezistencije među bakterijama otpadnih voda nedostatne usprkos saznanjima da su otpadne vode rezervoari rezistentnih bakterija putem kojih te bakterije dopijevaju u okoliš, a putem okoliša se mogu prenijeti natrag na ljude. Danas se približavamo točki u kojoj će normalna (osjetljiva) mikrobna populacija biti zamijenjena rezistentnom, a izvori djelotvornih antibiotika bit će iscrpljeni. Iako izgleda da se trenutno nalazimo u "postantibiotskoj eri", u kojoj je problem antibiotske rezistencije globalni, možemo ga premostiti razvijanjem novih alternativnih terapija i pristupa u liječenju bakterijskih infekcija, u kombinaciji s donošenjem odluka na globalnoj razini koje će usporiti širenje rezistentnih sojeva.

Cilj ovog rada bio je procijeniti horizontalni prijenos gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije putem plazmida iz bakterija bolničkih otpadnih voda u modelni patogen, *Escherichia coli* CV601 te karakterizirati mobilne plazmide. Otpadne vode bolnica izabrane su zbog velike prevalencije rezistentnih bakterija, ali i rezidualnih antibiotika koji pogoduju nastanku i širenju rezistencije. Transkonjuganti su testirani na osjetljivost na antibiotike iz skupine β -laktama, aminoglikozida, fluorokinolona i kombinaciju trimetroprima i sulfonamida, a njihovi plazmidi karakterizirani s obzirom na prisutnost gena za ESBL i karbapenemaze te skupinu inkompatibilnosti. Svrha ovog istraživanja bila je procijeniti rizik daljnjeg plazmidnog širenja gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije putem bolničkih otpadnih voda.

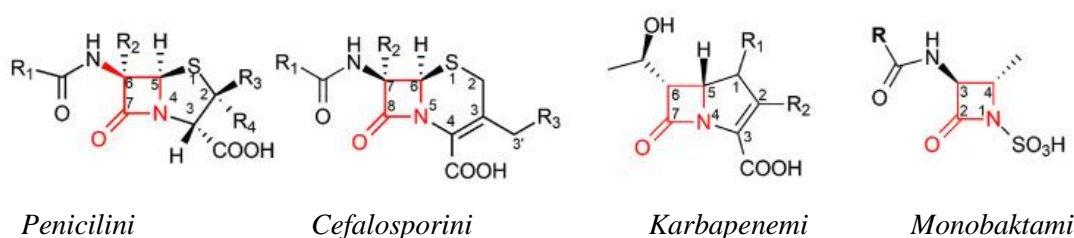
2. TEORIJSKI DIO

2.1. β -LAKTAMSKI ANTIBIOTICI

Uvođenje antibiotika u kliničku praksu četrdesetih godina prošlog stoljeća rezultiralo je drastičnim smanjenjem smrtnosti uzrokovane bakterijskim infekcijama. Antibiotici pripadaju antimikrobnim lijekovima koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama bakterija djelujući na njih bakteriostatski (inhibirajući rast) ili baktericidno (uništavanje bakterijskih stanica). Prvi otkriveni antibiotik, penicilin, pripada skupini β -laktamskih antibiotika. β -laktamski antibiotici su trenutno najkorištenija skupina antimikrobnih lijekova zbog svog širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti. U β -laktamske antibiotike se ubrajaju penicilini, cefalosporini 1.-4. generacije, karbapenemi i monobaktami (Pandey i Cascella, 2022).

2.1.1. Struktura i mehanizam djelovanja

β -laktamski antibiotici su baktericidni agensi koji inhibiraju sintezu bakterijske stanične stijenke kovalentnim vezanjem na esencijalne penicilin-vezujuće proteine (engl. *Penicillin Binding Protein, PBP*), enzime koji kataliziraju završne korake umrežavanja peptidoglikana u Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama (Bush i Bradford, 2016). U svojoj strukturi imaju jezgru tj. četveročlani prsten s amidnom funkcionalnom skupinom koji se obično naziva " β -laktamski prsten" ili "azetidinon". U penicilinima, cefalosporinima i karbapenemima, ovaj prsten je spojen s drugim 5- ili 6-članim prstenom, dok je u monobaktamima β -laktamski prsten monocikličan (slika 1).



Slika 1. Struktura jezgre različitih podskupina β -laktamskih antibiotika

U penicilinima, β -laktamski dio je fuzioniran na peteročlani tiazolidinski prsten, u cefalosporinima na šestoročlani dihidrotiazinski prsten, u karbapenemima na pirolinski prsten, a kod monobaktama, β -laktamski prsten nije fuzioniran ni s jednim drugim prstenom. U svim podskupinama, β -laktamski prsten je istaknut crvenom bojom (prema De Rosa i sur., 2021.)

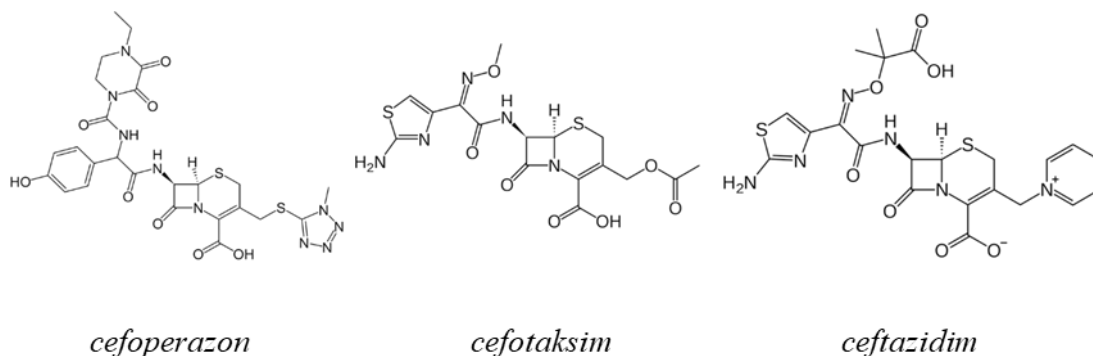
Ciljno mjesto β -laktama je PBP enzim koji ima N-terminalnu domenu transglikozilaze rezistentne na penicilin (uključena u formiranje linearnih glikanskih lanaca), C-terminalnu domenu transpeptidaze osjetljive na penicilin (uključena u umrežavanje peptidnih podjedinica) i serinski aminokiselinski ostatak u aktivnom mjestu koji je konzerviran kod svih članova obitelji PBP (Basu i sur., 1992). Mehanizam djelovanja β -laktamskih antibiotika uključuje vezanje karbonilnog dijela β -laktama na serinski nukleofil u aktivnom mjestu PBP-a što rezultira stvaranjem inaktivnog kompleksa acil-enzim (Georgopapadakou i sur., 1977). Dobiveni kompleks potom hidrolizira antibiotik, a inhibicija katalitičke aktivnosti PBP-a dovodi do promjena u strukturi stanične stijenke i nepravilnosti u obliku stanice, na primjer filamentacije, pseudomulticelularnih oblika ili lezija zbog čega se formiraju sferoplasti i dolazi do konačne stanične smrti i lize stanice (Cushnie i sur., 2016). Osim u aktivno mjesto, pojedini β -laktami kao što je ceftarolin, vežu se u alosteričko mjesto PBP2a iz *Staphylococcus aureus*, što rezultira povećanom osjetljivošću organizma na antibiotik (Gonzales i sur., 2015; Otero i sur., 2013).

2.1.2. Cefalosporini 3. generacije

Nedugo nakon otkrivanja prvog antibiotika primijećena je pojava rezistentnih sojeva na penicilin zbog čega je bilo potrebno pronaći učinkovitije antibiotike. Tijekom 1950-ih, otkriće prirodnog cefalosporina C izoliranog iz gljiva roda *Acremonium*, stabilnog na penicilinazu, otvorilo je novi put razvoju stotina novih cefalosporina koji su bili djelotvorni u liječenju infekcija uzrokovanih penicilin rezistentnim patogenim sojevima (Tansey i Reynolds, 2000). Različiti cefalosporini učinkoviti su u liječenju mnogih stanja, uključujući upalu pluća, infekcije kože i mekih tkiva, bakteriemiju i meningitis. Međutim, njihova široka uporaba rezultirala je razvojem rezistencije kod bakterija, zbog čega je postupno došlo do razvitka čak četiri generacije ove podskupine β -laktamskih antibiotika. Nastankom svake sljedeće generacije cefalosporina, poboljšani su određeni aspekti spektra antimikrobne aktivnosti (Reygaert, 2011). Praćenjem trendova potrošnje antibiotika 2019. godine primijećen je pad potrošnje cefalosporina 1. generacije, ali povećan trend potrošnje 3. generacije (Tambić Andrašević i sur., 2020).

U cefalosporine 3. generacije ubrajaju se cefoperazon, cefotaksim, ceftazidim, ceftizoksim, ceftriakson, cefiksim, cefpodosim-proksetil, cefdinir, cefditoren-pivoksil, cefibuten i moksalaktam (Francetić, 2015). To su polusintetski analozi s različitim kemijskim supstitucijama na 7-aminocefalosporskoj jezgri (slika 2), a različite kemijske modifikacije

rezultirale su poboljšanjem antibakterijskog spektra kao i farmakokinetičkih svojstava (Garzone i sur., 1983).



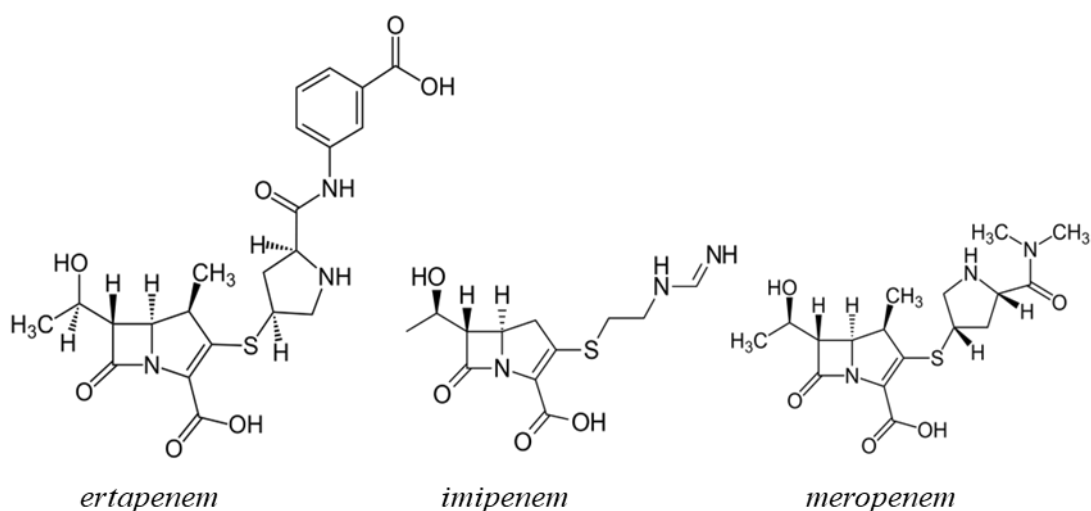
Slika 2. Kemijska struktura cefalosporina 3. generacije cefoperazona, cefotaksima i ceftazidima (prema Stocco i sur., 2020)

Glavna prednost ove generacije cefalosporina nad drugim generacijama je visok stupanj djelotvornosti protiv Gram-negativnih štapićastih bakterija (Paladino i sur., 2008). Osim toga, većina cefalosporina 3. generacije djelotvorna je protiv Gram-pozitivnih stafilokoka, s izuzetkom ceftazidima koji pokazuje smanjenu aktivnost (Bennett i Brown, 2003). Za razliku od cefalosporina 2. generacije, cefalosporini 3. generacije ceftazidim i cefoperazon učinkoviti su u liječenju bolničkih bakteremija zbog antimikrobnog djelovanja prema *P. aeruginosa* (Fernandes i sur., 2013). Druga vrlo bitna značajka ove podskupine β -laktama je mogućnost prelaska krvno-moždane barijere zbog čega se mogu primjenjivati u liječenju meningitisa i drugih infekcija centralnog živčanog sustava (Fernandes i sur., 2013). Intravenozna terapija cefotaksimom, ceftriaksonom ili ceftizoksimom prvi je izbor pri liječenju sepse ili meningitisa uzrokovanog Gram-negativnih bakterijama (O'Neill i sur., 2006).

2.1.3. Karbapenemi

Iako su cefalosporini 3. generacije poznati kao vrlo djelotvorni lijekovi širokog antibakterijskog spektra i povoljnih farmakoloških karakteristika (Reygaert, 2011), njihova učestala primjena dovela je do pojave rezistencije među bakterijama zbog čega se nametnula potreba za novom, moćnijom podskupinom β -laktama. Tako su razvijeni karbapenemi, vrlo moćni β -laktamski antibiotici koji se koriste kao lijekovi posljednje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama koje su često

višestruko rezistentne (Papp-Wallace i sur., 2011). Izrazita otpornost na hidrolizu pomoću ESBL posljedica je specifične strukture karbapenema (slika 3) koja se razlikuje od strukture ostalih β -laktamskih antibiotika. Strukturna razlika očituje se u smještaju ugljikovog atoma na C1 mjestu i prisutnost nezasićene dvostruke veze između ugljikovih atoma na pozicijama C2 i C3 tiazolidinskog prstena (El-Gamal i sur., 2017). Supstitucija sumpora na poziciji C1 i prisutnost trans-1-hidroksietil supstituenta na β -laktamskom prstenu omogućuju otpornost na hidrolizu (El-Gamal i sur., 2017; Jeon i sur., 2015). Karbapenemi se međusobno razlikuju po strukturi bočnih lanaca vezanih za β -laktamsku jezgru (slika 3). Međutim, bočni lanci uzrokuju i nestabilnost cijele molekule antibiotika zbog čega karbapenemi, za razliku od drugih β -laktamskih antibiotika, imaju najmanji broj predstavnika, a to su imipenem, ertapenem, meropenem i doripenem (Nicolau, 2008).

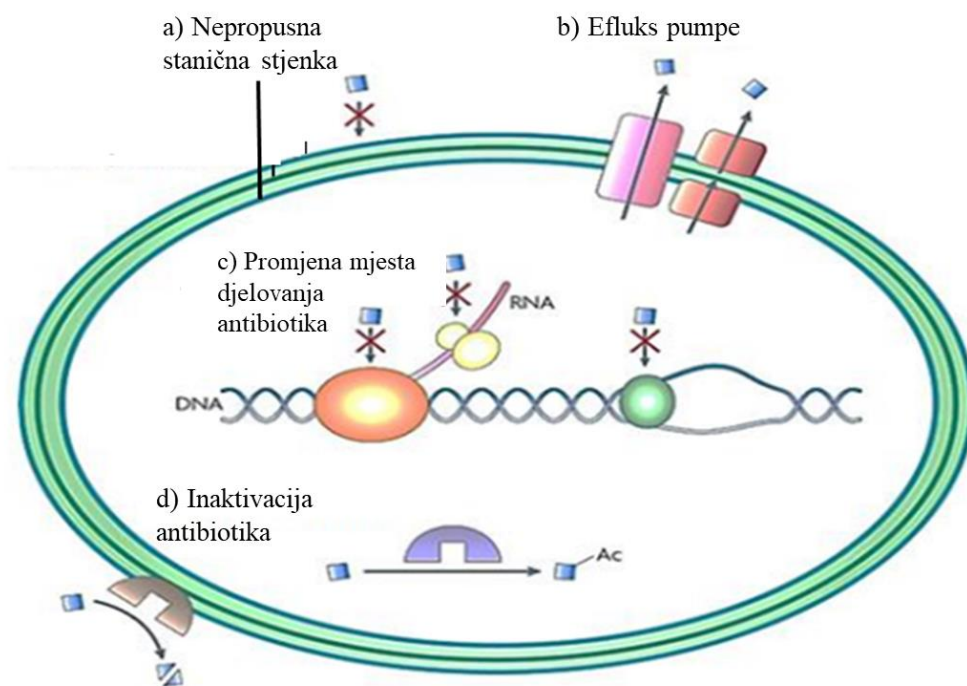


Slika 3. Kemijska struktura karbapenema ertapenema, imipenema i meropenema (*prema Kardos, 2020*)

2.2. REZISTENCIJA BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Bakterija se smatra rezistentnom ako je sposobna preživjeti učinak antibiotika (Džidić i sur., 2007). Ako je rezistencija posljedica normalnog genetičkog, strukturnog ili fiziološkog stanja bakterije riječ je o urođenoj rezistenciji. Primjerice, urođena rezistencija najčešćeg bolničkog patogena *Pseudomonas aeruginosa* na niz β -laktamskih antibiotika potječe od kromosomske, inducibilne AmpC β -laktamaze, velikog broja regulatornih gena te gena koji kodiraju efluks pumpe (Sardelić i Bedenić, 2009). Stečena rezistencija posljedica je mutacija u bakterijskom genomu ili horizontalnog prijenosa gena (HGT) (Blair i sur., 2015) i nastaje najčešće kao odgovor bakterije na promjene u okolišu. Horizontalni prijenos označava prijenos

genetičkog materijala iz jedne bakterijske stanice u drugu mehanizmima transformacije, transdukcije ili konjugacije (Sabtu i sur., 2015). Prijenos bakterijskih plazmida konjugacijom smatra se najčešćim HGT mehanizmom za širenje rezistentnih gena, dok se transformacija i transdukcija smatraju manje važnima.



Slika 4. Mehanizmi rezistencije na antibiotike u Gram-negativnim bakterijama (prema Allen i sur., 2010)

Mehanizmi rezistencije na antibiotike u Gram-negativnim bakterijama shematski su prikazani na slici 4, a uključuju:

- a) Npropusnost stanične stijenke kao posljedica urođene ili stečene rezistencije koja sprječava ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu (slika 4a)
- b) Stanični efluks, gdje se transmembranskim proteinima, efluks pumpama, antibiotik direktno izbacuje iz stanice ili izlučuje u periplazmatski prostor (slika 4b)
- c) Promjene u specifičnim mjestima u makromolekulama na koja se veže antibiotik (DNA, RNA, proteini) (slika 4c)
- d) Enzimska razgradnja ili inaktivacija antibiotika pomoću enzima (slika 4d)

2.2.1. Mehanizmi rezistencije na cefalosporine 3. generacije

Mehanizmi rezistencije na cefalosporine 3. generacije najčešće uključuju stabilnu hiperprodukciju AmpC β -laktamaza i produkciju ESBL enzima. Budući da cefalosporini 3. generacije nisu jaki induktori AmpC β -laktamaza, djelotvorni su u borbi protiv enterobaktera, citrobaktera i seracija sve dok oni proizvode fiziološke količine ovih enzima (Sanders i Sanders, 1992). Međutim, u prirodnoj populaciji nastaju spontani derepresirani mutanti koji bez prisutnosti induktora hiperproduciraju veliku količinu AmpC β -laktamaza. U tom slučaju cefalosporini 3. generacije su labilni supstrati za AmpC β -laktamaze (Andrašević i sur., 2009). Rizik od selekcioniranja ovakvih mutanata tijekom liječenja bakterijemije cefalosporinima 3. generacije iznosi oko 20 % (Chow i sur., 1991). Geni za AmpC β -laktamaze prvotno su bili smješteni na kromosomu, ali zbog evolucijskih prilagodbi bakterija, preneseni su s kromosoma na plazmide te su se počeli širiti među bakterijama u kojima nije bilo hiperprodukcije ovih enzima npr. *Klebsiella spp.* i *E. coli* (Livermore, 1998). Drugi mehanizam rezistencije na cefalosporine 3. generacije posredovan je ESBL enzimima, učestaliji je i predstavlja veći klinički problem. ESBL enzimi su nastali mutacijama u genima koji kodiraju za β -laktamaze širokog spektra poput *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} i *bla*_{SHV-1}. Zbog učestalog korištenja β -laktamskih antibiotika širokog spektra, penicilina i cefalosporina 1. i 2. generacije, bakterije su stalno producirale β -laktamaze prilikom čega su nastajale slučajne mutacije što je rezultiralo širenjem hidrolitičkog spektra β -laktama (Tomić Paradžik, 2019).

2.2.2. Vrste ESBL enzima

Po definiciji, ESBL su plazmidno kodirane β -laktamaze koje hidroliziraju peniciline, monobaktame, cefalosporine 1. i 2. generacije i cefalosporine 3. generacije, ali ne i cefamicine (npr. cefoksitin i cefotetan) i karbapeneme (npr. imipenem, meropenem i ertapenem) (Colodner, 2005). ESBL su heterogena skupina enzima koji međusobno dijele od 20 % do više od 99 % sličnosti (Jelić, 2018). Uglavnom su to derivati β -laktamaza TEM-1, TEM-2 i SHV-1. Do danas se opisuje više od 140 TEM i više od 60 SHV tipova ESBL. Prva TEM ESBL (TEM-3) nastala je zamjenom aminokiselina na aktivnim mjestima Glu104Lys i Gly238Ser enzima TEM-2 (Tomić Paradžik i sur., 2019). Daljnjim točkastim mutacijama dolazi do promjena u strukturi aktivnoga mjesta tako da i veće molekule, poput oksimino-cefalosporina, mogu ući i biti hidrolizirane. Analizom plazmida koji nose gene za ESBL varijantu TEM-a dokazan je visok stupanj različitosti plazmida što upućuje na visoku diversifikaciju gena i njihovu ugradnju u plazmide (Baraniak i sur., 2005). Zamjena aminokiselinskog ostatka glicina na poziciji 283 u enzimu SHV-1 rezultirala je nastankom ESBL varijante enzima nazvane

SHV-2 (Paterson i Bonomo, 2005). I ostale varijante SHV enzima nastale su većinom kao posljedica točkastih mutacija, a najraširenije među njima su SHV-5 i SHV-12. Treća podgrupa ESBL enzima, CTX-M, za razliku od ESBL varijanti TEM i SHV, nije nastala mutacijama poznatih β -laktamaza već prijenosom kromosomskih gena bakterija roda *Kluyvera* na plazmide (Paterson i Bonomo, 2005). Ovi enzimi su dobili ime po cefotaksimu (CTX) iz razloga što prema njemu imaju jaču aktivnost nego prema ostalim oksimino- β -laktamskim antibioticima. Poznate su preko 172 varijante CTX-M enzima te su svrstane u 5 grupa: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (Bonnet, 2004). OXA skupina ESBL enzima, oksacilinaze, prvotno je otkrivena u izolatima *Pseudomonas aeruginosa* s područja Turske i Francuske, a danas je većinom proširena među izolatima roda *Acinetobacter* (Naas i Nordmann, 1997). Sličnost među enzimima ove grupe iznosi 20 – 30 % zbog čega se smatralo da predstavljaju fenotipsku, a ne genotipsku grupu. Većina novootkrivenih OXA enzima nastala je točkastim mutacijama u OXA-2 i OXA-10 enzimima (Danel i sur., 1997). Neke oksacilinaze pokazuju slabu hidrolitičku aktivnost i prema karbapenemima.

2.2.3. Ostale ESBL

ESBL koje su pronađene i okarakterizirane u posljednjih dvadesetak godina, a nisu bile srodne dotad opisanim skupinama, svrstane su u posebnu grupu nazvanu ostale ESBL (Bradford, 2001). PER-1 (engl. *Pseudomonas extended-resistance*) je prva ESBL, a otkrivena je u Turskoj kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* (Nordmann i sur., 1993), a potom i u drugim bakterijama kao što su *Acinetobacter baumannii* i *Salmonella Typhimurium* (Vahaboglu i sur., 1996). Danas na području Turske 46 % bolnički izoliranih acinetobaktera i 11 % pseudomonasa luče PER-1 (Tomić Paradžik i sur., 2019). Iz PER-1 mutacijama je nastala ESBL PER-2 sa 86 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu. Iz PER-1, osim PER-2, razvile su se još 3 srodne ESBL: VEB-1, CME-1 i TLA-1. Navedene ESBL varijante pokazuju samo 40 – 50 % sličnosti u strukturi (Bradford, 2001). Jedna od novije otkrivenih varijanti ostalih ESBL enzima je varijanta GES (engl. *Guiana Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, *GES*), prethodnog imena IBC (engl. *Integron-Borne Cephalosporinases*, *IBC*). Ovi enzimi su kodirani genima smještenim na plazmidimima u sklopu integrona kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* i raznovrsnih enterobakterija, a pronađeno je 24 inačice koje se međusobno razlikuju po jednoj aminokiselinskoj zamjeni ili najviše tri koja određuje sposobnost hidrolize β -laktama i osjetljivosti na inhibitore (Tomić Paradžik i sur., 2019). Neki od ostalih neuobičajenih ESBL enzima uključuju BES-1, CME-1, VE-B-1, PER i SF te su svjedoci vrlo brze prilagodbe bakterija različitim supstratima i inhibitorima.

2.2.4. Karbapenemaze

Kao što je to slučaj i s ostalim β -laktamskim antibioticima, nedugo nakon uvođenja karbapenema u kliničku praksu pojavljuju se rezistentni izolati, a najefikasniji i dominantan mehanizam rezistencije temelji se na proizvodnji enzima karbapenemaza (Narayanan i sur., 2016). Karbapenem-rezistentni izolati enterobakterija (engl. *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*, CRE) predstavljaju veliki klinički problem u cijelom svijetu zbog suženog izbora antibiotika dostupnih za liječenje takvih infekcija. Karbapenemaze hidroliziraju sve β -laktamske antibiotike te su uglavnom otporne na djelovanje klasičnih inhibitora β -laktamaza. Sličnost karbapenemaza i PBP-a u aminokiselinskom slijedu konzerviranog aktivnog mjesta i tercijarnoj strukturi upućuje na to da su karbapenemaze nastale uslijed nasumičnih mutacija u PBP-u zbog čega su ti mutirani enzimi brže i bolje vršili deacilaciju odnosno uklanjali β -laktame iz aktivnog mjesta (Wax i sur., 2008). Godine 1980. Ambler je klasificirao β -laktamaze u 4 molekularna razreda (A, B, C i D) obzirom na primarnu strukturu, a karbapenemaze pripadaju u tri razreda: A, B i D.

Glavna karakteristika karbapenemaza razreda A je konzervirani serinski aminokiselinski ostatak u aktivnom mjestu enzima. Hidroliziraju širok spektar β -laktama: peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aztreonam, a inhibirane su klavulonskom kiselinom i tazobaktamom. Najznačajni predstavnici su SME (engl. *Serratia marcescens* enzyme, SME), KPC (engl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC), NmcA/IMI (engl. *not metalloenzyme carbapenemase/imipenem-hydrolysing β -lactamase*, NmcA/IMI), GES (engl. *Guiana extended-spectrum*, GES) i SHV-38 (engl. *sulphydryl variable*, SHV) (Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Geni koji kodiraju za KPC i GES lokalizirani su na plazmidima, a za NmcA/IMI i SME na bakterijskom kromosomu (Queenan i Bush, 2007). Smatra se da je KPC epidemiološki i klinički najznačajnija karbapenemaza iz Amblerovog razreda A zato što KPC-producirajući sojevi uglavnom uzrokuju sustavne bolesti i bolničke infekcije (Nordmann i Poirel, 2014). Do sada je u svijetu identificirano desetak varijanti KPC gena, klasificiranih od *bla*_{KPC-2} do *bla*_{KPC-13} (Chen i sur., 2014), a najznačajnije varijante su *bla*_{KPC-2} i *bla*_{KPC-3} koje se razlikuju u samo jednom aminokislinskom ostatku. Za razliku od KPC-a, karbapenemaza SME je kromosomski kodirana zbog čega još uvijek ne predstavlja veliki epidemiološki problem. Karbapenemaza SME-1 pronađena je 1982. godine u izolatima *Serratia marcescens*, ali rezervoar sojeva još uvijek nije utvrđen. NmcA i IMI su također kromosomski kodirane karbapenemaze koje se razlikuju samo u 3 % aminokiselinskih ostataka, a izolirane su iz sojeva *Enterobacter cloacae*. Pojavljuju se sporadično u kliničkim izolatima enterobakterija. U

skupini GES ESBL koju čini 9 grupa enzima, postoje 4 enzima (GES-2, GES-4, GES-5 i GES-6) koja pokazuju i karbapenemaznu aktivnost. GES enzim koji pripada molekularnom razredu A prvi put je pronađen u izolatu *K. pneumoniae* u Francuskoj 1998. godine (Poirel i sur., 2000). SFC i SHV skupine karbapenemaza sadrže samo po jednog člana: SFC-1 i SHV-38 (Bubonja-Šonje i Abram, 2014).

Karbapenemaze Amblerovog razreda B su metalo- β -laktamaze koje u aktivnom mjestu sadrže cink zbog čega su inhibirane kelatorima metalnih iona, a hidroliziraju širok spektar β -laktamskih antibiotika. Nisu inhibirane klasičnim komercijalno dostupnim inhibitorima β -laktamaza. U ovu grupu ubrajamo enzime NDM (engl. *New Delhi metallo- β -lactamase*, NDM), VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*, VIM), IMP (engl. *Imipenemase*, IMP), SPM (engl. *Sao Paulo metallo- β -lactamase*, SPM), SIM (engl. *Seoul imipenemase*, SIM), GIM (engl. *German imipenemase*, GIM), AIM (engl. *Adelaide imipenemase*, AIM), DIM (engl. *Dutch imipenemase*, DIM), KHM (C. freundii strain KHM243 – Kyorin Hospital MBL), SMB (engl. *Serratia MBL*, SMB), TMB (Tripoli MBL) i FIM (engl. *Florence imipenemase*, FIM) (Bubonja-Šonje i Abram, 2014). Obzirom na strukturnu raznolikost, karbapenemaze razreda B podijeljene su u 3 podskupine. U B1 podskupinu svrstane su sve klinički značajne karbapenemaze poput VIM, IMP i NDM, a glavno obilježje skupine je koordinacija atoma cinka u aktivnom mjestu s tri histidina i jednim cisteinom (Jelić, 2018). Širenje gena koji kodiraju za karbapenemaze VIM, IMP i NDM te u manjoj mjeri SPM, GIM i SIM, ubrzano je ugrađivanjem gena u plazmide i transpozone putem integrona. IMP-1 je prva dokazana metalo- β -laktamaza koja je pronađena u pseudomonasu rezistentnom na karbapeneme 1988. u Japanu (Watanabe i sur., 1991), a najveća prevalencija enterobakterija koje proizvode IMP danas je i dalje u zemljama dalekog istoka. VIM je trenutno najraširenija plazmidna metalo- β -laktamaza (Queenan i Bush, 2007) koja ima preko 40 alelskih inačica otkrivenih u brojnim državama diljem svijeta. Prva otkrivena, VIM-1, izolirana je u Italiji 1997. iz *P. aeruginosa* (Lauretti i sur., 1999). NDM-1 opisana je 2009. godine u Švedskoj u izolatu *K. pneumoniae* od bolesnika prethodno hospitaliziranog u Indiji (Nordmann i sur., 2011). Do sada je opisano 17 varijanti ovog enzima, a većina ih potječe iz Azije. Jedan od najvećih pokretača širenja NDM-1 producirajućih enterobakterija su međunarodna putovanja, a velika prevalencija zabilježena je u državama u kojima žive velike zajednice Indijaca i Pakistanaca npr. Ujedinjeno Kraljevstvo (Nordmann i Poirel, 2014).

Među već spomenutim ESBL oksacilinazama postoje i inačice (npr. OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-198) koje pokazuju slabu, ali značajnu hidrolitičku aktivnost prema karbapenemima te se svrstavaju u Amblerov razred D. Novije studije ukazuju na različitu antimikrobnu aktivnost tih enzima u različitim bakterijskim domaćinima, primjerice, kada su prisutne u *E. coli* ponašaju se kao karbapenemaze uskog spektra, a ako su prisutne unutar *Acinetobacter baumannii* ponašaju se kao karbapenemaze (Tomić Paradžik i sur., 2019). Karbapenemazna aktivnost oksacilinaza mnogo je manja nego aktivnost karbapenemaza drugih razreda tj. one mogu hidrolizirati imipenem, ali ne uvijek i meropenem. Rezistencija na karbapeneme obično se manifestira tek u kombinaciji s drugim mehanizmom rezistencije npr. gubitak porina vanjske membrane (Bubonja-Šonje i Abram, 2014).

2.3. OTPADNE VODE KAO MEDIJ ZA ŠIRENJE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE

Antibiotici ili njihovi aktivni metaboliti nakon terapijske primjene izlučuju se iz ljudskog organizma i ispuštaju zajedno s urinom i fekalijama u otpadne vode te povećavaju selektivni pritisak u populaciji bakterija. Selektivni pritisak pogoduje stvaranju antibiotičke rezistencije, ali i njezinom daljnjem širenju. Ipak, najveći rezervoari rezidualnih antibiotika i gena za rezistenciju na antibiotike predstavljaju otpadne vode iz farmaceutskih industrija i bolnica. Primjerice, Bielen i sur. (2017) pokazali su kako otpadne vode iz proizvodnje i formulacije antibiotika sadrže visoke koncentracije različitih antibiotika. Industrijske otpadne vode i sedimenti njihovih recipijentnih voda spremnici su poznatih i potencijalno novih gena za rezistenciju na makrolide odnosno β -laktame, 2,4- diaminopirimidine, sulfonamide i tetracikline (Milaković i sur., 2019). U Republici Hrvatskoj otpadne vode bolnica se ne podvrgavaju pred-tretmanu prije ispusta u kanalizacijsku mrežu već idu direktno na uređaj za pročišćavanje otpadnih voda. To nosi rizik da bolnički patogeni koji su često višestruko rezistentni prežive obradu u uređajima za pročišćavanje (Smyth i sur., 2020; Hultman i sur., 2018) te putem izlazne vode dospiju u okoliš.

2.4. ULOGA PLAZMIDA U ŠIRENJU REZISTENCIJE NA CEFALOSPORINE 3. GENERACIJE

Raširenost gena za rezistenciju na antibiotike najvećim dijelom je posljedica horizontalnog prijenosa gena među bakterijama istih ili različitih vrsta, a tu glavnu ulogu imaju plazmidi: ekstrakromosomske kružne molekule DNA koje imaju sposobnost samostalne replikacije. Plazmidi često nose više od jednog gena za rezistenciju pa posljedično istovremeno ispoljavaju rezistenciju na različite skupine antibiotika (Caratolli, 2013). Osim gena za

rezistenciju, na plazmidima se često nalaze i pokretni genetički elementi, poput transpozona i insercijskih sekvenci, zbog čega postoji mnogo različitih plazmida koje je teško okarakterizirati i svrstati u srodne skupine. Ipak, usprkos velikoj plastičnosti plazmidnih molekula, na temelju konzervirane regije odgovorne za proces replikacije (replikon), plazmidi se svrstavaju u skupine inkompatibilnosti (Carattoli, 2013). Tako primjerice plazmidi iste skupine imaju isti replikon i međusobno su inkompatibilni pa ne mogu u isto vrijeme egzistirati u bakterijskoj stanici. Neki plazmidi, npr. plazmidi skupine IncF, imaju uzak spektar bakterijskih domaćina, dok su plazmidi iz skupina IncA/C, IncL/M i IncN izrazito promiskuitetni i konjugiraju između velikog broja bakterijskih vrsta (Thomas i Nielsen, 2005). Epidemiološki najznačajniji plazmidi spadaju u 6 skupina inkompatibilnosti: IncF, IncA/C, IncI, IncHI, IncN i IncL/M (Jelić, 2018).

Plazmidi imaju vrlo važnu ulogu u globalnom širenju rezistencije, posebice u širenju rezistencije posredovane ESBL enzimima i karbapenemazama. Geni za ove enzime su uglavnom se nalaze na velikim konjugativnim plazmidima koji se relativno brzo šire među bakterijskom populacijom. Plazmidi koji nose ESBL gene vrlo često, gotovo uvijek, nose i druge gene odgovorne za rezistenciju na različite skupine antibiotika pa tako doprinose širenju višestruke rezistencije (Wang i sur., 2015). Branger i suradnici (2018) pokazali su da se stjecanje različitih gena koji kodiraju ESBL dogodilo neovisno kroz višestruke događaje na srodnim ili nepovezanim plazmidima. Zbog toga većina ESBL gena nisu vezani za specifične plazmide već se nalaze na plazmidima različitih skupina inkompatibilnosti. Plazmidi iz Inc skupina A/C, ColE, F, HI2, I1 α / γ , K, L/M, N, P i R povezani su sa širenjem gena koji kodira za SHV-12 β -laktamazu (Liakopoulos i sur., 2016). Geni koji kodiraju za VIM karbapenemaze najčešće se nalaze na plazmidima skupina IncA/C, IncR, IncHI2, IncI1 i IncW (Martínez-Martínez i González-López, 2014). Nadalje, insercijske sekvence, integroni i transpozoni na plazmidu također pogoduju širenju gena za rezistenciju. Tako primjerice prisutnost Tn2-blaTEM-1 transpozona na IncF plazmidu pogoduje uspješnom širenju *bla*_{CTX-M-15} gena (Branger i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. POPIS MATERIJALA

3.1.1. Uzorci otpadne vode i recipijentne bakterije

Uzorci neobrađenih otpadnih voda uzeti su iz dviju bolnica grada Zagreba: Kliničke bolnice „Sv. Duh“ (H1) i Kliničkog bolničkog centra „Rebro“ (H2) i služili su kao donori plazmida u pokusima egzogene izolacije plazmida. Uzorci otpadnih voda su prikupljeni tri dana za redom u dvije replike te odmah profiltrirani (60-90 mL) kroz membranske filtere napravljene od miješanog celuloznog estera, promjera 47 mm i veličine pora 0,2 µm (GE Healthcare Life Sciences, Whatman, Njemačka) metodom membranske filtracije. Filteri su potom usitnjeni sterilnim škarama i prebačeni u 10 %-tni triptoza sojin bujon (TSB) i 15 %-tni glicerol te pohranjeni na -80 °C.

Kao recipijent u egzogenoj izolaciji plazmida korišten je soj bakterije *Escherichia coli* CV601 koji je rezistentan na antibiotike kanamicin i rifampicin te nosi gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein GFP (engl. *green fluorescence protein*, *GFP*) zbog kojeg kolonije ovog soja pod ultraljubičastim svjetlom svijetle zeleno.

3.1.2. Antibiotici

3.1.2.1. Antibiotici korišteni za pripremu selektivnih hranjivih podloga

- rifampicin (RIF, prašak za otopinu >98 %-tne čistoće, TCI, Japan)
- kanamicin monosulfat (KAN, prašak za otopinu, Thermo Scientific, Njemačka)
- cefotaksim (CTX, prašak za otopinu Sigma-Aldrich, Izrael)

3.1.2.2. Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom za disk difuzijski test po Kirby-Baueru

- amoksicilin (AML, 25 µg; OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- amoksicilin/klavulanska kiselina (AMC, 20/10 µg; BD BBLTM, SAD)
- cefaleksin (CL, 30 µg; OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- cefuroksim (CXM, 30 µg; BD BBLTM, SAD)
- ceftazidim (CAZ, 10 µg; OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- cefepim (FEP, 30 µg; BD BBLTM, SAD)
- ertapenem (ETP, 10 µg; BD BBLTM, SAD)
- imipenem (IPM, 10 µg; BD BBLTM, SAD)
- meropenem (MEM, 10 µg; BD BBLTM, SAD)
- gentamicin (GM, 10 µg; BD BBLTM, SAD)
- trimetoprim/sulfametoksazol (SXT 1,25/23,75; BD BBLTM, SAD)

- ciprofloksacin (CIP, 5 µg; BD BBLTM, SAD)
- cefotaksim (CTX, 5 µg; OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)

3.1.2.3. Antibiotici korišteni za testiranje osjetljivosti izolata na antibiotike metodom mikrodilucije

- ertapenem, prašak za otopinu (Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- imipenem/cilastatin, prašak za otopinu (Aptamedica, Slovenija)
- meropenem, prašak za otopinu (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- kolistin sulfat, prašak za otopinu (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.2.4. Priprema izvornih otopina antibiotika i antimikotika

Izvorne (engl. *stock*) otopine antibiotika pripravljene su otapanjem praška antibiotika u sterilnoj miliQ vodi u koncentraciji od 50 mg/mL za rifampicin i kanamicin te 5 mg/mL za cefotaksim. Otopine su profiltrirane kroz filter Filtropur S promjera pora 0,2 µm (Sarstedt, Njemačka) i čuvane na – 20 °C.

Izorna otopina antimikotika cikloheksimida pripravljena je otapanjem praška cikloheksimida čistoće >98 % (Sigma- Aldrich, Kina) u sterilnoj miliQ vodi u koncentraciji od 10 mg/mL. Otopina je profiltrirana kroz filter Filtropur S i čuvana na -20 °C.

3.1.2.5. Priprema radnih otopina antibiotika za testiranje osjetljivosti izolata na antibiotike metodom mikrodilucije

Radne otopine korištenih karbapenemskih antibiotika i kolistina pripravljene su otapanjem praška antibiotika u sterilnoj miliQ vodi u koncentraciji od 1 mg/mL. Radne otopine antibiotika su svježe pripremane svaki dan.

3.1.3. Hranjive podloge i otopine

3.1.3.1. Priprema čvrste Luria-Bertani hranjive podloge sa i bez dodatka antibiotika i cikloheksimida

Luria-Bertani (LB) čvrsta hranjiva podloga pripravljena je otapanjem 25 g LB Broth podloge (Difco, Francuska) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana autoklaviranjem pri 121°C 15 minuta. Za eksperiment su korištene i LB podloge s dodatkom cikloheksimida (100 mg/L) (LB+CHX₁₀₀), cikloheksimida (100 mg/L), rifampicina (50 mg/L) i kanamicina (50 mg/L) (LB+CHX₁₀₀+RIF₅₀+KAN₅₀) te LB podloge s dodatkom cikloheksimida (100 mg/mL), rifampicina (50 mg/L), kanamicina (50 mg/L) i cefotaksima (2 mg/L) (LB+CHX₁₀₀+RIF₅₀+KAN₅₀+CTX₂). Antibiotici i cikloheksimid su u

sterilnim uvjetima u laminaru (LN 090-120, Kompass, Turska) dodani u podlogu nakon sterilizacije i hlađenja na 50-55 °C.

3.1.3.2. Priprema Mueller-Hintonovog agara

Mueller-Hintonov agar pripremljen je otapanjem 38 g Mueller-Hintonove čvrste podloge (OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo) u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C 15 minuta.

3.1.3.3. Priprema CHROMagar Orientation čvrste podloge s dodatkom selektivnih antibiotika

CHROMagar Orientation čvrsta kromogena podloga (CHROMagar, Francuska) pripremljena je otapanjem 33 g podloge u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C. Nakon sterilizacije i hlađenja na 50-55 °C, podlozi je u sterilnim uvjetima dodan cikloheksimid (100 mg/L), rifampicin (50 mg/L), kanamicin (50 mg/L) i cefotaksim (2 mg/L) (ORI+CHX₁₀₀+RIF₅₀+KAN₅₀+CTX₂).

3.1.3.4. Priprema 10 %-tnog TSB

10 %-tni TSB (engl. *Tryptic Soy Broth, TSB*) pripremljen je otapanjem 4 g podloge (Difco, Francuska) u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.1.3.5. Priprema Mueller-Hintonove tekuće podloge

Mueller-Hintonova tekuća podloga pripremljen je otapanjem 21 g Mueller-Hintonovog bujona (Merck, Njemačka) u 1 L destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C u trajanju od 15 minuta.

3.1.3.6. Priprema Mueller-Hintonovog bujona II

Mueller-Hintonov bujon II (s podešenim kationima; Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljen je otapanjem 22 g Mueller-Hinton broth II podloge u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C kroz 10 min.

3.1.3.7. Priprema 1 x Tris-acetatnog EDTA pufera (TAE)

U 900 mL destilirane vode dodano je 100 mL 10 x TAE komercijalnog pufera (Invitrogen, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.1.3.8 Priprema fiziološke otopine

Fiziološka otopina (0,85 % NaCl) pripravljena je otapanjem 0,85 g natrijeva klorida u 1 L destilirane vode nakon čega je provedena sterilizacija u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 minuta.

3.1.3.9 Priprema agaroznog gela

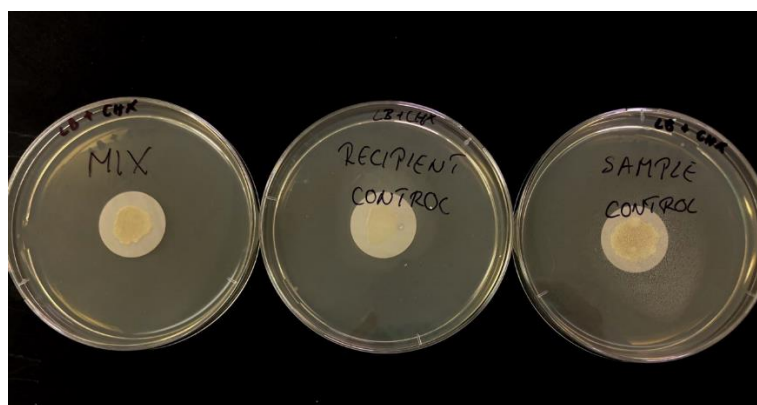
Agarozni gel (1,5 %) pripremljen je otapanjem (u mikrovalnoj pećnici) agaroze (2,25 g; Sigma, SAD) u 1 x TAE puferu (150 mL). Prije izlivanja gela u kadicu za elektroforezu (OWL DR-14, Thermo Scientific, SAD), u gel je dodan etidijev bromid (0,5 µg/mL) koji interkalira u baze te zbog toga DNA možemo vizualizirati pod UV svjetlom.

3.2. EGZOGENA IZOLACIJA PLAZMIDA KOJI NOSE GENE ZA REZISTENCIJU NA CEFOTAKSIM

3.2.1. Transkonjugacija

Recipijentna bakterija *E. coli* CV601 uzgojena je preko noći inkubacijom pri 28 °C (inkubator „Mettler BE 200“, Mettler, Njemačka) na krutoj LB podlozi s rifampicinom i kanamicinom. Jedna kolonija bakterija s krute podloge precijepljena je u 8 mL tekuće 10 %-tne TSB podloge te uzgajana preko noći na 28 °C na tresilici (160 rpm) (Innova 4340, New Brunswick Scientific, SAD). Ta je prekonoćna kultura recipijenta potom raspoređena u eppendorf tubice po 2 mL te centrifugirana (centrifuga 5430R, Eppendorf, Njemačka) 5 minuta na 5000 rpm. Supernatant je odbačen, a peleti recipijenta isprani s 1 mL 10 %-tnog TSB-a te centrifugirani 5 minuta na 5000 rpm. Ovaj korak ponovljen je dva puta kako bi se maknuli zaostali antibiotici. Pelet recipijenta iz jedne od četiri eppendorf tubice resuspendiran je u 10 %-tnom TSB, a ostali su pohranjeni na -20 °C. 10 mL uzorka donora (bakterije iz otpadne vode na filteru) stavljeno je na tresilicu 2 sata na 60 rpm.

Miks za transkonjugaciju pripremljen je miješanjem 3 mL uzorka donora i 100 µL recipijenta (*E. coli* CV106) u plastičnim epruvetama (50 mL), nakon čega je ta mješavina razdijeljena u dvije eppendorf tubice po 1,5 mL. Za kontrolu uzorka tj. donora (*sample control*) uzeto je 3 mL donora raspodijeljenog u tubice po 1,5 mL, a za recipijentnu kontrolu (*recipient control*) uzet je ostatak kulture recipijenta (900 µL). Uzorci miksa i obje kontrole centrifugirani su 10 minuta na 3100 g, nakon čega je odbačen supernatant. Bakterijske stanice u talogu su potom resuspendirane u 100 µL 10 %-tnog TSB-a.

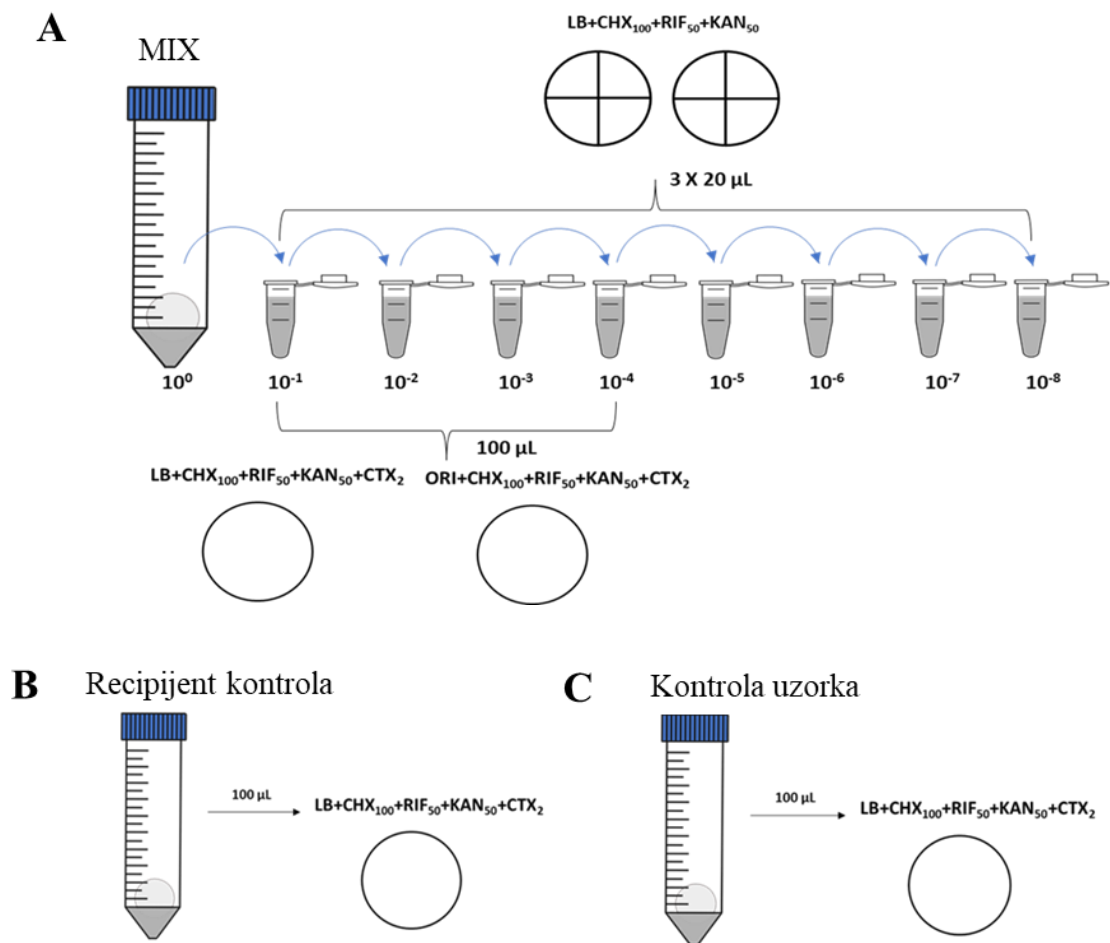


Slika 5. Nacjepljivanje miksa, recipijentne kontrole i kontrole uzorka na filter na LB podlozi sa cikloheksimidom (vlastita fotografija)

Na 3 suhe LB podloge sa cikloheksimidom sterilnom pincetom stavljeni su filteri Durapore (promjer pora $0,22 \mu\text{m}$, PVDF Membrane, Merck, Irska). Na sredinu filtera ispipetiran je cijeli volumen miksa, recipijentne kontrole i kontrole uzorka (slika 5). Bakterijske stanice na filterima uzgajane su preko noći inkubacijom na $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2. Nacjepljivanje na selektivne podloge

Nakon prekonocne inkubacije, bakterijske stanice su prikupljene s filtera vorteksiranjem filtera u 2 mL fiziološke otopine u plastičnim epruvetama (50 mL). Potom su pripravljena serijska razrjeđenja bakterijskih stanica iz miksa od 10^{-1} do 10^{-8} u sterilnoj fiziološkoj otopini. Od svakog razrjeđenja nacijepljeno je po $20 \mu\text{L}$ u triplikatu na ploče LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀ kako bi se odredio broj bakterija recipijenta u miksu koji je potreban za izračunavanje frekvencije transkonjugacije (slika 6A). Istovremeno je na podloge LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ i ORI+ RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ nacijepljeno u duplikatu po $100 \mu\text{L}$ razrjeđenja miksa od 10^{-1} do 10^{-4} kako bi izolirali potencijalne transkonjugante.

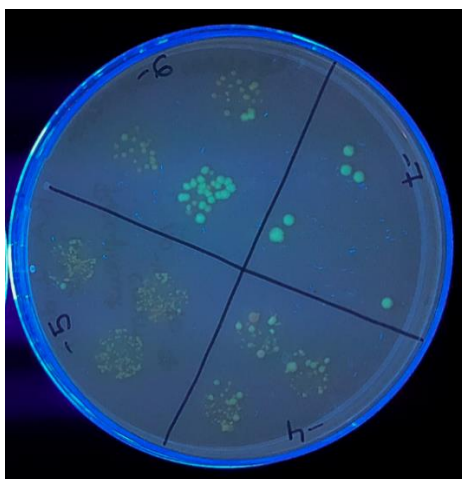


Slika 6. Shema naciepljivanja na selektivne podloge

A Decimalna razrjeđenja (10^{-1} - 10^{-8}) suspenzije bakterija iz miksa naciepljuju se po 20 μL u triplikatu na ploče LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀. 100 μL razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-4} naciepljuje se u duplikatu na LB i ORI podloge sa selektivnim antibiotikom. 100 μL suspenzije bakterija s filtera za **B** recipijent kontrolu i **C** kontrolu uzorka naciepljuje se na LB ploče sa selektivnim antibiotikom.

Provjera rasta recipijentnog soja i donora provedena je naciepljivanjem 100 μL recipijentne kontrole i kontrole uzorka na podloge LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ (slika 6B i C).

Sve podloge inkubirane su 48 sati na 28 °C.

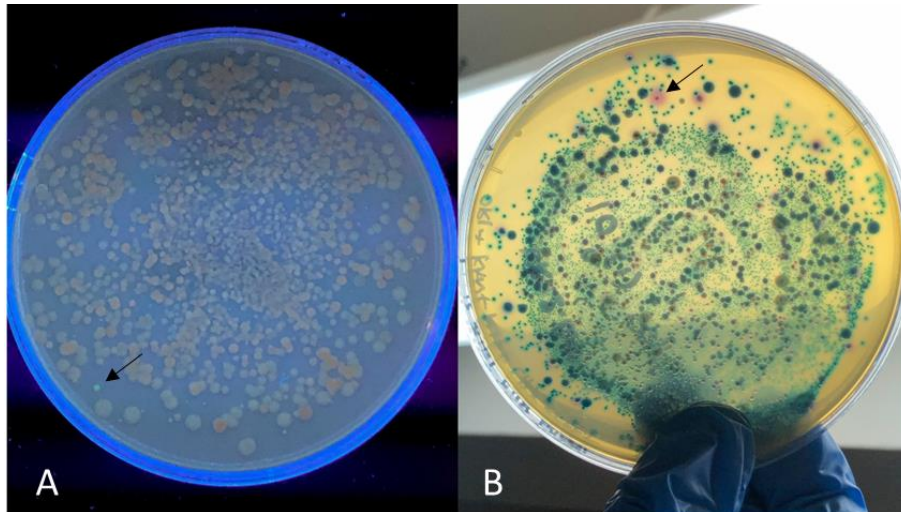


Slika 7. Porasle kolonije bakterija iz miksa pod UV-svijetlom. Kolonije recipijentne bakterije *E. coli* CV601 svijetle zelenim svjetlom (vlastita fotografija)

Porasle kolonije recipijentnih bakterija su izbrojane pod ultraljubičastim svjetlom (transiluminator UVT-20L, Herolab GmbH, Njemačka), zbog toga što soj *E. coli* CV601 eksprimira protein GFP koji fluorescira zeleno pod ultraljubičastim svjetlom zbog čega ga je moguće fenotipski razlikovati od ostalih bakterija iz miksa (slika 7). Broj bakterija recipijenta potreban je za izračunavanje frekvencije transkonjugacije koja se računa kao omjer broja transkonjuganata (CFU/mL) i recipijenta (CFU/mL).

3.2.3. Selekcija i pročišćavanje potencijalnih transkonjuganata

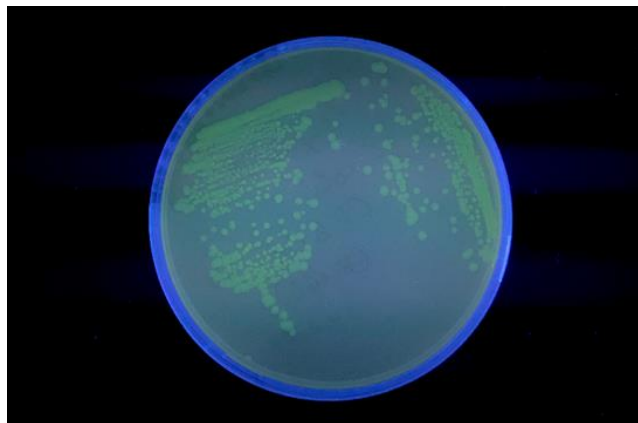
Nakon 48-satnog rasta selekcionirani su potencijalni transkonjuganti odnosno kolonije koje imaju fenotipska obilježja recipijentnog soja. To su kolonije koje na LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlozi na transiluminatoru svijetle zeleno (slika 8A), i ružičaste kolonije na ORI+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlozi (slika 8B). Porasle kolonije iz uzorka recipijentne kontrole i kontrole uzorka također su pogledane pod UV svjetlom. Na ploči s kontrolom recipijenta ne smije biti bakterijskog rasta, jer genom recipijentnog soja nema gene za rezistenciju za CTX. Kontrola uzorka pokazuje posjeduju li bakterije iz uzorka rezistenciju na cefotaksim.



Slika 8. A Porasle kolonije bakterija iz miksa na LB+ RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlozi pod UV svjetlom (vlastita fotografija)

Strelicom je označena zelena kolonija odnosno potencijalni transkonjugant **B** Porasle kolonije bakterija iz miksa na ORI+ RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlozi. Strelicom je označena ružičasta kolonija odnosno potencijalni transkonjugant.

Potencijalni transkonjuganti precijepljeni su na svježe LB podloge s antibioticima metodom iscrpljivanja i inkubirani 48 sati na 28 °C, nakon čega su ponovo provjereni pod UV-svjetlom. Porasle kolonije koje su svijetlile pod UV svjetlom precijepljene su ponovno na svježe podloge metodom iscrpljivanja u svrhu dobivanja čiste kulture i veće količine biomase (slika 9).



Slika 9. Potencijalni transkonjugant pod UV-om nakon pročišćavanja na LB+ RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlozi (vlastita fotografija)

Po jedna kolonija potencijalnih transkonjuganata nakon iscrpljivanja precijepljena je u tekuću LB+RIF₅₀+KAN₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ podlogu te inkubirana 24 sata pri 28 °C na tresilici.

Nakon inkubacije čistoća i izgled stanica potencijalnih transkonjuganata provjereni su pod svjetlosnim mikroskopom (M20EB, Wild Heerbrugg, Švicarska) nakon bojanja safraninom (Biogram 4 kit, Biognost, Hrvatska) na povećanju od 1000X s imerzijskim objektivom. Ukoliko je kultura bila čista, pripremljen je glicerolski stock miješanjem 900 µL 50 %-tnog glicerola (Gram-mol, Hrvatska) i 900 µL tekuće bakterijske kulture (konačna koncentracija glicerola 25 %). Tako pripremljeni glicerolski stockovi potencijalnih transkonjuganata spremljeni su na – 20 °C do daljnje obrade.

3.3. DETEKCIJA POZITIVNIH TRANSKONJUGANATA POMOĆU METODE BOX-PCR

Kako bi se potvrdilo da je fluorescirajući potencijalni transkonjugant doista recipijentna bakterija *E. coli* CV 601 s plazmidom koji nosi rezistenciju na CTX, provedena je metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) ponavljajućih sljedova koristeći početnicu BOX, tzv. BOX PCR (Martin i sur., 1992). Ta metoda uključuje korištenje samo jedne početnice BOX_A1R CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG (Metabion International AG, Njemačka) koja se veže na raspršene BOX sekvence što rezultira da se tijekom PCR-a umnaža više fragmenata različite veličine što daje odgovarajući DNA profil tzv. *fingerprint* specifičan za pojedinu vrstu bakterija.

Tablica 1. Komponente BOX-PCR reakcije

Komponenta	Volumen [µL] za 1 PCR reakciju	Konačna koncentracija
H ₂ O	10,75	
10 X pufer (Thermo Scientific, Litva)	5	1x
mješavina deoksinukleozid-trifosfata, 2 mM svakog (Thermo Scientific, Litva)	2,5	0,2mM
25 mM MgCl ₂ (Thermo Scientific, Litva)	3,75	3,75 mM
DMSO	1,25	5 %
Početnica BOX_A1R	0,5	0,2 µM
Taq polimeraza (Thermo Scientific, Litva)	0,25	1,25 U/A
DNA	1	

DNA kalup za BOX-PCR pripremljen je tako da je sterilnom ezom uzeta 1 kolonija potencijalnog transkonjuganta i resuspendirana u 50 μL vode bez nukleaza (Qiagen, Njemačka) te kuhana 10 minuta na 99 $^{\circ}\text{C}$ u termobloku (Corning LSE, Kanada). 1 μL tako pripremljene DNA dodan je u PCR reakcijsku smjesu ukupnog volumena 25 μL i sastava navedenog u tablici 1. Umnažanje je provedeno na uređaju PCRMax Alpha Cyclor 1 (Antylia Scientific, SAD) kroz 30 ciklusa pod uvjetima prikazanim u tablici 2. Kao pozitivna kontrola korištena je skušana biomasa recipijentne bakterije *E. coli* CV 601, a kao negativna kontrola korištena je voda umjesto bakterijske DNA.

Tablica 2. Uvjeti BOX-PCR reakcije

Faza	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Trajanje
Početna denaturacija	94	7 min
Denaturacija	94	1 min
Sparivanje početnica	53	1 min
Sinteza komplementarnih lanaca	65	8 min
Završna elongacija	65	16 min

Dobiveni PCR produkti razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom u 1,5 %-tnom agaroznom gelu. U prvu, središnju i zadnju jažicu gela naneseo je 2 μL DNA markera (1 kb; Promega, SAD), a u ostale jažice po 10 μL PCR produkta pomiješanog s 2 μL boje (Gel loading solution, Sigma, SAD). Elektroforeza je trajala 4 sata pri naponu od 40 V, nakon čega su PCR produkti vizualizirani pod UV svjetlom na transiluminatoru. Transkonjuganti koji su imali DNA vrpce iste kao recipijentni soj išli su na daljnju obradu.

3.4. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI TRANSKONJUGANATA NA ANTIBIOTIKE

3.4.1. Testiranje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom disk difuzije

Osjetljivost transkonjuganata određena je metodom disk difuzije po Kirby-Baueru za antibiotike iz skupine β -laktama (amoksicilin, amoksicilin/klavulanska kiselina, cefaleksin, cefuroksim, ceftazidim, cefepim, ertapenem, imipenem, meropenem i cefotaksim), aminoglikozida (gentamicin), fluorokinolona (ciprofloksacin) te sulfonamida i trimetoprima (trimetoprim/sulfametoksazol). Transkonjuganti iz glicerolskog stocka naciyepljeni su u svježu tekuću podlogu (10 %-tni TSB) s dodatkom rifampicina i kanamicina (50 mg/L) te cefotaksima (2 mg/L) i inkubirani preko noći na 28 $^{\circ}\text{C}$. Prekonoćna kultura precijepljena je na Mueller-

Hintonov agar i inkubirana na 35 °C preko noći. Iz nekoliko morfološki sličnih kolonija prekončne kulture napravljene su suspenzije bakterijskih stanica u 0,85 %-tnoj fiziološkoj otopini do optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarland-a. Optička gustoća mjerena je denzitometrom („Suspension Turbidity Detector DEN-1“, Biosan, Latvija). Na površinu Mueller-Hintonovog agara vatenim štapićem ravnomjerno je nanjena homogenizirana bakterijska suspenzija u obliku bakterijske livade razmazivanjem u tri smjera. Na bakterijsku livadu nanešeni su diskovi koji sadržavaju definiranu količinu pojedinog antibiotika pomoću dispnzera („BLL Sensi Disc 8 Place Dispenser“, BD BBLTM, SAD). Rezultati su očitani nakon 18 sati inkubacije na 35 °C mjerenjem promjera inhibicijskih zona oko diskova. Rezultati su interpretirani prema EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022) smjernicama.

3.4.2. Testiranje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom mikrodilucije

Osjetljivost svih transkonjuganata na kolistin testirana je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), a osjetljivost na antibiotike iz skupine karbapenema - ertapenem, meropenem i imipenem, samo onim transkonjugantima koji su metodom disk difuzije pokazali rezistenciju na jedan ili više karbapenema. MIK vrijednosti su određene pomoću metode mikrodilucije koja uključuje dvostruka serijska razrjeđenja navedenih antibiotika u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Pojedinačne kolonije transkonjuganata nacijepljene su u tekuću Mueller Hintonovu podlogu za prekončnu inkubaciju pri 37 °C uz vrtnju (150 rpm). Također su uzgojene i prekončne kulture kontrolnih bakterijskih sojeva: *Escherichia coli* ATCC® 25922™ koja je osjetljiva na karbapenemske antibiotike i kolistin te *Escherichia coli* NCTC® 13846™ koja je osjetljiva na karbapenemske antibiotike i rezistentna na kolistin te recipijentni soj *Escherichia coli* CV601 koji je osjetljiv na karbapenemske antibiotike i kolistin. Prekončne kulture razrijeđene su do gustoće koja je odgovarala $5 \cdot 10^5$ CFU/mL. Testiranje osjetljivosti na karbapenemske antibiotike provedeno je u mikrotitarskim tretiranim pločicama koristeći Mueller-Hintonov bujon. Raspon koncentracija meropenema i imipenema u ovom istraživanju bio je od 1 do 64 mg/L, dok je koncentracija ertapenema bila u rasponu od 0,25 do 16 mg/L. Testiranje osjetljivosti na kolistin provedeno je u mikrotitarskim netretiranim pločicama koristeći Mueller-Hintonov bujon II s podešenim kationima. Koncentracijski raspon kolistina bio je od 1 do 64 mg/L. U svaku je jažicu dodan pripadajući bujon te antibiotik u odgovarajućoj koncentraciji u ukupnom volumenu od 90 µL te 10 µL bakterijske suspenzije gustoće $5 \cdot 10^5$ CFU/mL tako da je ukupni volumen u svakoj jažici bio 100 µL. Uz kontrolne sojeve koji imaju poznate MIK vrijednosti (*E. coli* ATCC® 25922™ -

karbapenemi <1 mg/L, kolistin 0,5 do 1 mg/L; *E. coli* NCTC® 13846™ karbapenemi <1 mg/L; kolistin 4 mg/L), svaka mikrotitarska pločica je sadržavala jažice s bujonom bez antibiotika kao kontrola rasta bakterija (mora biti prisutno zamućenje). Mikrotitarske pločice su inkubirane pri temperaturi od 35 °C u trajanju od 18 h nakon čega je očitana vrijednost MIKa, a to je ona koncentracija pri kojoj dolazi do vidljive inhibicije rasta bakterijske kulture (nema zamućenja). Dobiveni rezultati su interpretirani prema EUCAST (2022) smjernicama.

3.5. IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

Izolacija plazmidne DNA transkonjuganata provedena je koristeći komplet reagensa za izolaciju plazmidne DNA "Plasmid mini prep kit" (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. 100 µL kulture iz glicerolskog stocka naciepljeno je u 1,5 mL LB tekuće podloge u koju je dodan cefotaksim (2 mg/L) te je inkubirano preko noći na 28 °C. Te su prekonodne kulture potom centrifugirane 3 minute na 10 000 rpm, nakon čega je supernatant odbačen. Pelet bakterijskih stanica resuspendiran je u 250 µL Pufera P1 (Qiagen) u kojeg je prethodno dodana RNAza A (Qiagen). Zatim je dodano 250 µL Pufera P2 (Qiagen), a reakcija lize stanica je zaustavljena dodavanjem Pufera N3 (Qiagen) nakon 5 minuta. U digestoru je potom dodano 100 µL kloroforma (Merck, Njemačka) nakon čega su eppendorf tubice stavljene 5-10 minuta na led kako kloroform ne bi ispario. Poslije hlađenja, smjesa se centrifugira 10 minuta pri 14 000 rpm. U čiste eppendorf tubice ispipetirano je 750 µL supernatanta te dodano 75 µL 3M NaOAc, pH 5.2. Nadalje, dodano je 750 µL hladnog izopropanola (Gram-mol, Hrvatska) nakon čega su tubice centrifugirane na maksimalnoj brzini 25 minuta na 4°C. Supernatant je odbačen, a talog plazmidne DNA ispran sa 70 %-tnim etanolom (LabExpert, Slovenija) i centrifugiran pri maksimalnoj brzini 4 minute. Korak ispiranja s etanolom ponovljen je još jedanput. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant, a talog resuspendiran u 50 µL vode bez nukleaza. Koncentracija izolirane plazmidne DNA izmjerena je na NanoDrop spektrofotometru (BioSpec Nano, Shimadzu, Japan) te razrijeđena u vodi bez nukleaza na 10 ng/µL i pohranjena na -20 °C do PCR analize.

3.6. DETEKCIJA ESBL GENA POMOĆU METODA PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE

Izolirana plazmidna DNA iz transkonjuganata korištena je u reakciji PCR-a u svrhu detekcije prisutnosti 9 ESBL gena: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{SME}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} i *bla*_{CTX-M-9}. Detekcija gena *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} i *bla*_{PER} provedena je u istoj reakcijskoj smjesi - "multiplex PCR grupa 1", gena *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} i *bla*_{SME} u "multiplex PCR grupi 2" dok su geni za *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} i *bla*_{CTX-M-9} grupe analizirani zasebno u tzv. "singlplex

reakcijama". Volumen reakcijske smjese iznosio je 12 μL neovisno o tome sadržava li reakcija jedan (singleplex) ili više parova početnica (multiplex). Količina dodanog razrijeđenog DNA kalupa iznosila je 0,5 μL , a sastav ostalih komponenata smjese naveden je u tablici 3. Sekvence početnica (sintetizirane u komercijalnom servisu Microsynth, Švicarska) navedene su u tablici 4. Za svaku PCR reakciju napravljena je pozitivna kontrola koja je uključivala DNA iz bakterije pozitivne na određeni gen i negativna kontrola s vodom umjesto DNA.

Tablica 3. Sastav **A** Singleplex i **B** Multiplex PCR reakcijske smjese za umnažanje odabranih gena

A	Komponenta	Volumen [μL] za 1 PCR reakciju	B	Komponenta	Volumen [μL] za 1 PCR reakciju
	EmeraldAmpMix PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	7,5		EmeraldAmpMix PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	7,5
	Uzvodna početnica	0,25		Uzvodne početnice	3 x 0,25
	Nizvodna početnica	0,25		Nizvodne početnice	3 x 0,25
	H ₂ O	4		H ₂ O	3
	DNA	0,5		DNA	0,5

Uvjeti PCR reakcija bili su sljedeći: 1) početna denaturacija kalupa DNA u trajanju od 2:30 minuta pri 94 °C, 2) faza umnažanja PCR produkta trajala je 35 ciklusa za multiplexe i 30 ciklusa za singleplexe, a sastojala od tri segmenta: a) denaturacije DNA kalupa pri 94 °C u trajanju od 30 za multiplexe i 20 sekundi za singleplexe, sparivanja početnica i denaturiranog DNA kalupa u vremenu od 30 sekundi za multiplexe i 25 sekundi za singleplexe pri temperaturi specifičnoj za svaki par početnica i navedenoj u tablici 4. i c) elongacijskog segmenta na 72 °C pri kojem se sintetizirao komplementarni lanac DNA, nakon čega je uslijedila 3) faza završne elongacije na 72 °C u trajanju od 2 minute te hlađenje na 4 °C.

PCR produkti detektirani su horizontalnom gel elektroforezom u 1,5 %-tnom agaroznom gelu s dodatkom etidij bromida za vizualizaciju DNA. U prvu i zadnju jažicu naneseo je 2 μL DNA markera („GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), a u ostale jažice po 12,5 μL PCR produkta svakog uzorka. Elektroforeza je trajala 1 sat pri 100 V, nakon čega su umnoženi fragmenti vizualizirani pod UV svjetlom.

Tablica 4. Sekvence početnica korištenih u PCR reakcijama za umnažanje gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije

Reakcijska smjesa	Gen	Veličina amplikona [pb]	Oznaka početnice	Sekvenca početnice (5'-3')	Ta [°C]	Ref.
Multiplex PCR grupa 1	<i>bla</i> _{TEM}	620	TEM-F TEM-R	GCGGTAAGATCCTTGAGAGT TACGATACGGGAGGGCTTA	55	Jelić (2018)
	<i>bla</i> _{SHV}	494	SHV-F SHV-R	TTCGCCTGTGTATTATCTCC CGCCTCATTCAGTTCCG		
	<i>bla</i> _{PER}	349	PER-F PER-R	CTGGGCTCCGATAATGA CTGGTCGCCWATGATGA		
Multiplex PCR grupa 2	<i>bla</i> _{VEB}	673	WEB-F WEB-R	ATGCCAGAATAGGAGTAGC AATTGTCCATTCCGTAAGTAAT	58	Jelić (2018)
	<i>bla</i> _{GES}	504	GES-F GES-R	CTAGCATCGGGACACAT GACAGAGGCAACTAATTCG		
	<i>bla</i> _{SME}	350	SME-F SME-R	GCTCAGGTATGACATTAGGT CCAATCAGCAGGAACACTA		
Singlplex reakcija	grupa <i>bla</i> _{CTX-M-1}	864	M13U M13L	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	55	Saladin i sur., (2002)
Singlplex reakcija	grupa <i>bla</i> _{CTX-M-2}	866	M25U M25L	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	55	Saladin i sur., (2002)
Singlplex reakcija	grupa <i>bla</i> _{CTX-M-9}	870	M9U M9L	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	55	Saladin i sur., (2002)

Ta–temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA (engl. „annealing temperature“, Ta)
Ref.-referenca

3.7. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE POMOĆU METODA PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE

Pomoću metoda PCR i agarosne gel elektroforeze na svim transkonjugantima provedena je detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za karbapenemaze iz razreda A (*bla*_{KPC}), razreda B (*bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{IMP}) i razreda D (*bla*_{OXA-48}). PCR je proveden u singleplex reakcijama čiji su uvjeti opisani u poglavlju 3.6, a sastav reakcijske smjese prikazan u tablici 3A. Sekvence početnica navedene su u tablici 5.

Tablica 5. Sekvence početnica korištenih u PCR reakcijama za umnažanje gena za rezistenciju na karbapeneme

Gen	Veličina amplikona [pb]	Oznaka početnice	Sekvenca početnice (5'–3')	Ta [°C]	Ref.
<i>bla_{KPC}</i>	793	KPC-F KPC-R	AGTTCTGCTGTCTTGTCT CTTGTCATCCTTGTTAGGC	57	Jelić (2018)
<i>bla_{OXA-48}</i>	744	OXA-48A OXA-48B	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	57	Poirel i sur., (2004)
<i>bla_{NDM}</i>	813	NDM-F NDM-R	ATGGAATTGCCCAATATTATGC TCAGCGCAGCTTGTCGG	57	Revathi i sur., (2013)
<i>bla_{VIM}</i>	442	Vimf Vimr1	GGTGAGTATCCGACAGTC CAGCACCRGGATAGAAGAG	55	Jelić, (2018)
<i>bla_{IMP}</i>	235	IMP-f1 IMP-r1	GGYGTTTATGTTTCATACWTC GGATYGAGAATTAAGCCAATC		

Ta–temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA (engl. „annealing temperature“, Ta)

Ref.-referenca

3.8. ODREĐIVANJE SKUPINE INKOMPATIBILNOSTI PLAZMIDA PCR METODOM ZA IDENTIFIKACIJU REPLIKONA

Plazmidi izolirani iz transkonjuganata dalje su podvrgnuti tipizaciji prema skupinama inkompatibilnosti (tzv. "Inc skupine") koristeći PCR metodu za identifikaciju replikona (engl. *PCR-based replicon typing, PBRT*) u kojoj se koriste početnice specifične za najučestalije Inc skupine plazmida zabilježenih u enterobakterija. Prvi put su je opisali Carattoli i sur. (2005) čije početnice, korištene u ovom radu, obuhvaćaju 18 različitih grupa inkompatibilnosti (HI1, HI2, I1-I γ , X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIA i FrepB). Također, korištene su početnice ColE, ColE_{TP}, U i R preuzete iz rada Garcia-Fernandez i sur. (2009).). Za potvrdu IncL/M skupine, osim standardnih početnica preuzetih iz studije Carattoli i sur. (2005), korištene su i početnice *repA*, *traU* i *paraA* iz studije Poirel i sur., (2011) koje umnažaju gene koji sudjeluju u replikaciji, transferu i preraspodjeli plazmida. Sekvence početnica (sintetizirane u akreditiranom servisu Microsynth, Švicarska) navedene su u tablici 6, a u tablici 7. prikazani su uvjeti PCR reakcija s obzirom na rad iz kojeg su početnice preuzete. Replikoni HI1, HI2 i I1-I γ analizirani su zajedno u Multipleks PCR grupi 1; X, L/M (Carattoli i sur., 2005) i N u Multipleks PCR grupi 2; FIA, FIB i W u Multipleks PCR grupi 3; Y, P i FIC u Multipleks PCR grupi 4; A/C, T i FIIA u Multipleks PCR grupi 5 dok su ostali replikoni analizirani u "singleplex" PCR reakcijama. Sastav reakcijske smjese identičan je sastavu PCR

reakcija za umnažanje rezistentnih gena prikazanom u tablici 3 i opisanom u poglavlju 3.6. Produkti PCR-a vizualizirani su na način također opisan u poglavlju 3.6.

Tablica 6. Početnice korištene u tipizaciji plazmida PBRT metodom

Replikon	Veličina amplikona [pb]	Oznaka i sekvenca početnice (5'–3')	Ta [°C]	Ref.
HI1	471	HI1f: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC HI1r: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	60	Carattoli i sur., (2005)
HI2	644	HI2f: TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC HI2r: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	60	Carattoli i sur., (2005)
I1-Iγ	139	I1f: CGAAAGCCGGACGGCAGAA I1r: TCGTCGTTCGCCAAGTTCGT	60	Carattoli i sur., (2005)
X	376	Xf: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT Xr: TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTAGC	60	Carattoli i sur., (2005)
L/M	785	L/Mf: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG L/Mr: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	60	Carattoli i sur., (2005)
	925	RepA-A: GACATTGAGTCAGTAGAAGG RepA-B: CGTGCAGTTCGTCTTTCCGGC	55	Poirel i sur., (2011)
	577	TraU-A: ATCTCACGCAATCTACGTC TraU-B: TCGCGTCATGCGTGATCTTC		
	532	ParA-A: GCAGTGA AACGTTGATCAG ParA-B: GATCGCAATGCGTCTTGGTG		
N	559	Nf: GTCTAACGAGCTTACCGAAG Nr: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	60	Carattoli i sur., (2005)
FIA	462	FIAf: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG FIAr: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	60	Carattoli i sur., (2005)
FIB	702	FIBf: GGAGTTCAGACACGATTTTCTG FIBr: CTCCGTCGCTTCAGGGCATT	60	Carattoli i sur., (2005)
W	242	Wf: CCTAAGAACAACAAGCCCCCG Wr: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	60	Carattoli i sur., (2005)
Y	765	Yf: AATTCAAACAACACTGTGACGCTG Yr: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	60	Carattoli i sur., (2005)
P	534	Pf: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA Pr: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	60	Carattoli i sur., (2005)
FIC	262	FICf: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG FICr: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	60	Carattoli i sur., (2005)
A/C	465	A/Cf: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA A/Cr: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	60	Carattoli i sur., (2005)
T	750	Tf: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT Tr: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	60	Carattoli i sur., (2005)
FIIIs	270	FIIIf: CTGTGCTAAGCTGATGGC FIIIr: CTCTGCCACAACTTCAGC	60	Carattoli i sur., (2005)
F _{repB}	270	FrepBf: TGATCGTTAAGGAATTTTG FrepBr: GAAGATCAGTCACACCATCC	52	Carattoli i sur., (2005)
K	160	K/Bf: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC Kr: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	60	Carattoli i sur., (2005)
B/O	159	K/Bf: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC B/Or: TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA	60	Carattoli i sur., (2005)
ColE	187	oricoEf: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoEr: GGCGAAACCCGACAGGACT	57	Garcia-Fernandez i sur., (2009)
ColE _{TP}	106	oricoEf: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoETr: GGTTTACCGGTGTCATTCC	57	Garcia-Fernandez i sur., (2009)
R	251	IncRf: TCGCTTATTCTGCTTCAGC IncRr: GTGTGCTGTGTTATGCCTCA	62	Garcia-Fernandez i sur., (2009)
U	843	IncUf: TCACGACACAAGCGCAAGGG IncUr: TCATGGTACATCTGGGCGC	62	Garcia-Fernandez i sur., (2009)

Ta–temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA (engl. „annealing temperature“, Ta)

Ref.-referenca

Tablica 7. Uvjeti PCR reakcije za identifikaciju skupine inkompatibilnosti plazmida

	Carattoli i sur., (2005)		Garcia-Fernandez i sur., (2009)		Poirel i sur., (2011)	
	Temperatura [°C]	Trajanje	Temperatura [°C]	Trajanje	Temperatura [°C]	Trajanje
Početna denaturacija	94	5 min	94	5 min	94	2:30 min
Denaturacija	94	1 min	94	1 min	94	25 s
Sparivanje početnica	60*	30 s	57**	30 s	55	25 s
Sinteza komplementarnog lanca	72	1 min	72	1 min	72	1 min
Završna elongacija	72	5 min	72	5 min	72	2 min

* Za početnicu F_{repB} sparivanje početnica s kalupom DNA odvija se pri temperaturi od 52 °C.

** Za početnice IncR i IncU sparivanje početnica s kalupom DNA odvija se pri temperaturi od 62 °C

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju praćeno je horizontalno širenje gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije između bakterija bolničkih otpadnih voda. Cilj istraživanja bio je pratiti plazmidni prijenos ESBL gena iz bakterija bolničkih otpadnih voda u recipijentni soj *E. coli* CV601 kao modelni patogen metodom egzogene izolacije plazmida. Dobivenim transkonjugantima je potom testirana osjetljivost na antibiotike metodama disk difuzije i mikrodilucije. Plazmidi izdvojeni iz transkonjuganata su analizirani na prisutnost gena za ESBL i karbapenemaze te skupinu inkompatibilnosti primjenom metoda PCR-a i agarozne gel elektroforeze.

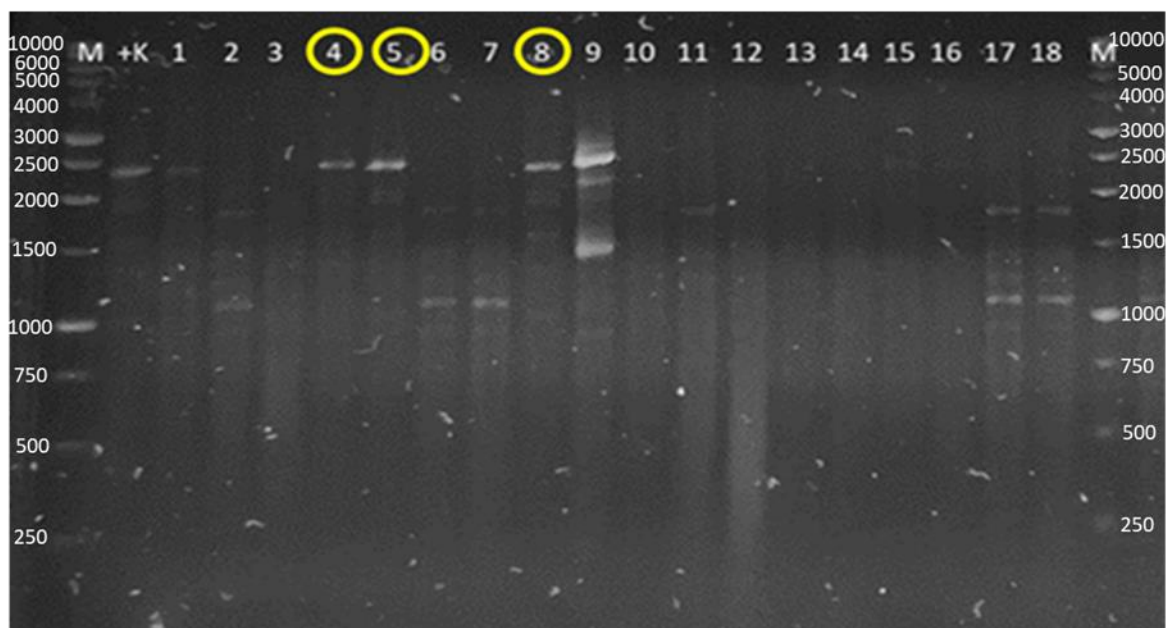
U nastavku su prikazani rezultati uspješnosti transkonjugacije iz bakterija otpadne vode u *E. coli* CV601 te fenotipski profil rezistencije dobivenih transkonjuganata. Također su prikazani rezultati analize ESBL i karbapenemaznih gena na mobilnim plazmidima kao i rezultati klasifikacije tih plazmida prema skupinama inkompatibilnosti.

4.1. DETEKCIJA MOBILNIH PLAZMIDA KOJI NOSE ESBL GENE

Osim u kliničkih patogena, ESBL producirajući plazmidi se sve češće opisuju i u okolišnim bakterijama, napose onima iz otpadnih voda, što je potvrđeno i u ovom istraživanju.

Nakon provedene selekcije na dvije različite podloge na temelju fenotipa i dodatnog pročišćavanja, potencijalni transkonjuganti potvrđeni su BOX-PCR-om usporedbom s recipijentnim sojem *E. coli* CV601. S obzirom na to da u otpadnoj vodi postoje bakterije koje prirodno fluoresciraju, selekcija i potvrda transkonjuganata samo na temelju fenotipa nije bila pouzdana. Iz tog razloga korištena je metoda BOX-PCR-a koja omogućuje razlikovanje 31 različitog genotipa *E. coli* (Kotłowski i sur., 2020).

Na slici 10 prikazana je agarozna gel elektroforeza produkata BOX-PCR-a transkonjuganata i pozitivne kontrole. Prema rezultatima, DNA *fingerprint* recipijentne bakterije odgovara jednoj intenzivnoj vrpici veličine oko 2400 pb i tri slabije od 1000, 1500 i 2000 pb (jažica 2). Svi potencijalni transkonjuganti s istim *fingerprint-om* kao i pozitivna kontrola *E. coli* CV601 (primjerice u jažicama 4 i 5) smatraju se potvrđenim transkonjugantima odnosno *E. coli* CV601 koja je primila plazmid na kojem se nalazi ESBL gen/i.



Slika 10. Analiza DNA umnožene BOX-PCR-om na 1,5 %-tnom agaroznom gelu

M – DNA marker raspona veličine 250-10000 pb, +K – pozitivna kontrola, -K – negativna kontrola. Žutom bojom su označeni neki od transkonjuganata koji imaju isti *fingerprint* kao i pozitivna kontrola *E. coli* CV601 (K+)

Potvrđena su 4 takva transkonjuganta iz otpadne vode Kliničke bolnice „Sv. Duh“ (H1), a 7 transkonjuganata je potvrđeno iz otpadne vode Kliničkog bolničkog centra „Rebro“ (tablica 8). Iz izračunatog omjera broja transkonjuganata i recipijenta dobiveno je da frekvencija transkonjugacije za otpadnu vodu bolnice H1 iznosi $1,50 \times 10^{-7}$, a za otpadnu vodu bolnice H2 $7,37 \times 10^{-8}$.

Tablica 8. Ukupan broj potvrđenih transkonjuganata u uzorcima bolničkih otpadnih voda, izračunate koncentracije transkonjuganata i recipijenta (CFU/mL) te frekvencija transkonjugacije

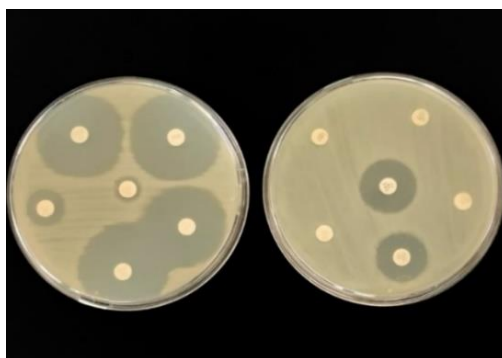
Bolnica	Broj transkonjuganata	Transkonjugant CFU/mL	Recipijent CFU/mL	Frekvencija transkonjugacije
H1	4	$8,00 \cdot 10^2$	$5,33 \cdot 10^9$	$1,50 \cdot 10^{-7}$
H2	7	$1,40 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^{10}$	$7,37 \cdot 10^{-8}$

González i suradnici (2019) također su koristili metodu egzogene izolacije plazmida u svrhu praćenja horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju na tetraciklin među bakterijama otpadnih voda farmaceutske industrije. Frekvencija transkonjugacije koju su dobili ($3,16 \cdot 10^{-6}$) bila je veća nego u ovom istraživanju, moguće zbog očekivano većeg selektivnog pritiska zaostalih antibiotika u industrijskim otpadnim vodama u odnosu na bolničke.

Rezistencija na cefalosporine 3. generacije uzrokovana ESBL enzimima čiju proizvodnju kodiraju geni na plazmidima prvi put je opisana u Europi sredinom 1980-tih godina. Zbog činjenice da se ti plazmidi relativno lako šire među istovrsnim sojevima, ali i među sojevima različitih vrsta, rezistencija posredovana ESBL je danas raširena u cijelom svijetu (Papp-Wallace i sur., 2011) te je odgovorna za epidemije bolničkih infekcija. Novija istraživanja ukazuju na prisutnost ESBL producirajućih enterobakterija u komunalnim i bolničkim otpadnim vodama (Paredes Páliz i sur., 2019). U istraživanju Zhenga i sur. (2020) geni za ESBL i karbapenemaze detektirani su u različitim bakterijskim vrstama porijeklom iz sirove i obrađene otpadne vode triju bolnica na području Kine. Studije provedene u prošlom desetljeću na području Hrvatske (2000. – 2010.) ukazale su na visoku prevalenciju ESBL-producirajućih *E. coli* i *K. pneumoniae* među kliničkim izolatima (Vranić-Ladavac i sur., 2010; Tonkić, 2006). Godine 2020. 16 % kliničkih *E. coli* bilo je okarakterizirano kao ESBL-producirajuće (Tambić Andrašević i sur., 2021). Međutim, znanstvena literatura problematikom ESBL-producirajućih bakterija iz okoliša na području Hrvatskoj vrlo je oskudna.

4.2. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI TRANSKONJUGANATA NA ANTIBIOTIKE

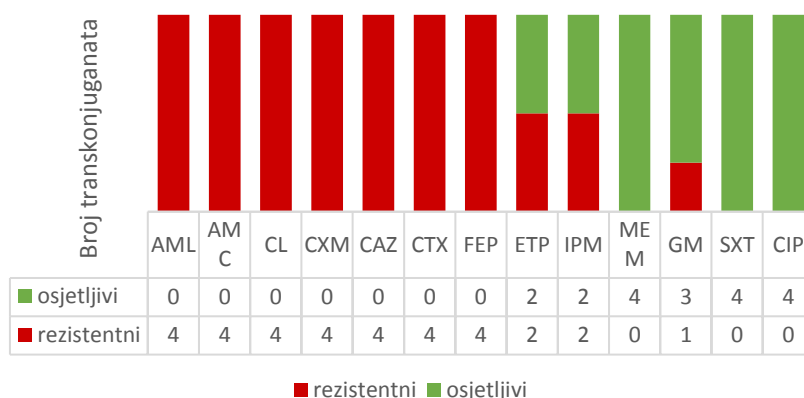
Osjetljivost transkonjuganata na antibiotike testirana je metodom disk difuzije tako što se izmjeri promjer zone inhibicije oko diska kako je prikazano na slici 11 te metodom mikrodilucije mjerenjem MIK-a. Pritom je testirana osjetljivost svakog transkonjuganta na ukupno 15 antibiotika razvrstanih u 9 skupina: 1) penicilini: (AMC, AML), 2) cefalosporini 1. generacije (CL), 3) cefalosporini 2. generacije (CXM), 4) cefalosporini 3. generacije (CAZ, CTX) , 5) cefalosporini 4. generacije (FEP), 6) karbapenemi (ETP, IPM, MEM), 7) aminoglikozidi (GM), 8) kombinacija sulfonamida i trimetoprima (SXT) te 9) fluorokinoloni (CIP).



Slika 11. Primjer disk difuzijskog testa gdje se mjerio promjer zone inhibicije oko diska nakon 18 sati inkubacije na 35 °C (vlastita fotografija)

Na slikama 12 i 13 prikazan je broj osjetljivih i rezistentnih transkonjuganata porijekom iz otpadnih voda dviju bolnica s obzirom na ispitivanu skupinu antibiotika.

Transkonjuganti porijeklom iz otpadne vode bolnice H1 (slika 12) bili su rezistentni na ispitivane peniciline (AMC, AML) i sve cefalosporine (CL, CXM, CAZ, CTX i FEP), što je bilo očekivano, jer ESBL enzimi hidroliziraju peniciline i cefalosporine svih generacija. Međutim, ono što zabrinjava je zapažanje da je polovica transkonjuganata bila rezistentna i na karbapeneme ertapenem i imipenem što upućuje na vjerojatnu prisutnost enzima karbapenemaza koji hidroliziraju ove antibiotike. Trenutno su karbapenemi antibiotici prvog izbora u liječenju teških infekcija uzrokovanih sojevima koji proizvode ESBL (Papp-Wallace i sur., 2011) pa rezistencija na ovu podskupinu antibiotika značajno smanjuje izbor antibiotika dostupnih za liječenje. Svi transkonjuganti iz otpadne vode bolnice H1 osjetljivi su na karbapenem meropenem, fluorokinolon ciprofloksacin, kombinaciju trimetroprima i sulfonamida te aminoglikozid gentamicin, osim jednog transkonjuganta koji je rezistentan na gentamicin.



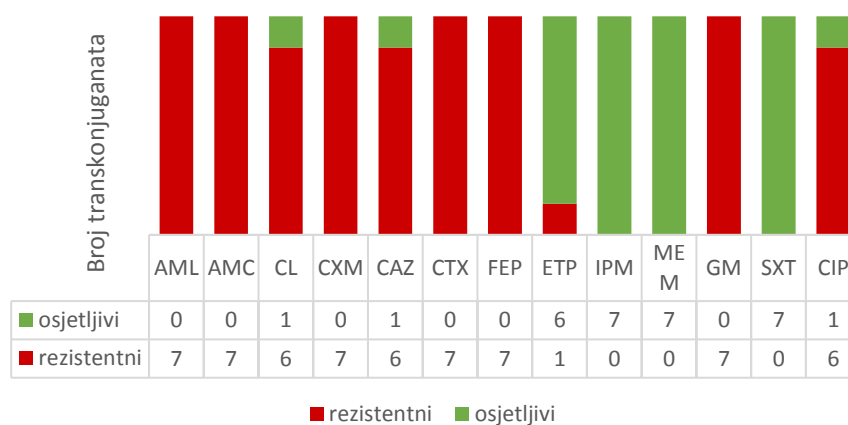
Slika 12. Profil rezistencije transkonjuganata iz bolnice H1, AML-amoksicilin, AMC-amoksicilin/klavulanska kiselina, CL-cefaleksin, CXM-cefuroksim, CAZ-ceftazidim, CTX-cefotaksim, FEP-cefepim, ETP-ertapenem, IPM-imipenem, MEM-meropenem, GM-gentamicin, SXTsulfametoksazol/trimetoprim, CIP-ciprofloksacin

U tablici su naznačeni brojevi osjetljivih i rezistentnih transkonjuganata po antibiotiku

Kao što je bilo očekivano, svi transkonjuganti porijeklom iz otpadne vode bolnice H2 (slika 13) bili su rezistentni na ispitivane peniciline (AMC, AML) i sve cefalosporine (CL, CXM, CAZ, CTX i FEP), osim transkonjuganta H2B koji je bio osjetljiv na cefaleksin (cefalosporin 1. generacije) i ceftazidim (cefalosporin 3. generacije). U Hrvatskoj je podskupina cefalosporina u 2020. godini činila 30 % ukupne bolničke potrošnje antibiotika te

bilježi trend porasta s najvišom vrijednošću potrošnje do sada (Tambić Andrašević i sur., 2020). Očekivano, povećana uporaba cefalosporina dovela je do porasta broja ESBL-producirajućih patogena koji su često višestruko rezistentni, što predstavlja izazov u liječenju (Livermore, 2012).

Iz slike 13 nadalje je vidljivo da su svi transkonjuganti iz otpadne vode bolnice H2 pokazali osjetljivost na sva tri karbapenemska antibiotika (ETP, IPM i MEM) što upućuje na odsutnost gena za karbapenemaze na ovim plazmidima. Izuzetak je transkonjugant H2B koji je ispoljavao rezistenciju na ertapenem. Suprotno transkonjugantima iz otpadne vode bolnice H1, svi transkonjuganti iz otpadne vode bolnice H2 bili su rezistentni na gentamicin, a gotovo svi (osim jednog) su dodatno ispoljavali rezistenciju na ciprofloksacin. Ovo zapažanje upućuje na zaključak da se na ovim plazmidima, pored ESBL gena, nalaze i geni za rezistenciju na aminoglikozide i fluorokinolone, što se često opisuje u literaturi (Pitout i Laupland, 2008; Paterson, 2006). Nadalje, zapažena karakteristika transkonjuganata iz otpadne bolničke vode H2 da ispoljavaju rezistenciju na aminoglikozide i fluorokinolone, za razliku od transkonjuganata iz otpadne bolničke vode H1, je najvjerojatnije posljedica veće izloženosti bakterija iz bolnice H2 navedenim antibioticima u usporedbi s bolnicom H1. U konačnici, slično kao i u slučaju bolnice H1, svi transkonjuganti iz otpadne vode bolnice H2 bili su osjetljivi na kombinaciju trimetroprima i sulfonamida.



Slika 13. Profil rezistencije transkonjuganata iz bolnice H2, AML-amoksisilin, AMC-amoksisilin/klavulanska kiselina, CL-cefaleksin, CXM-cefuroksim, CAZ-ceftazidim, CTX-cefotaksim, FEP-cefepim, ETP-ertapenem, IPM-imipenem, MEM-meropenem, GM-gentamicin, SXTsulfametoksazol/trimetoprim, CIP-ciprofloksacin

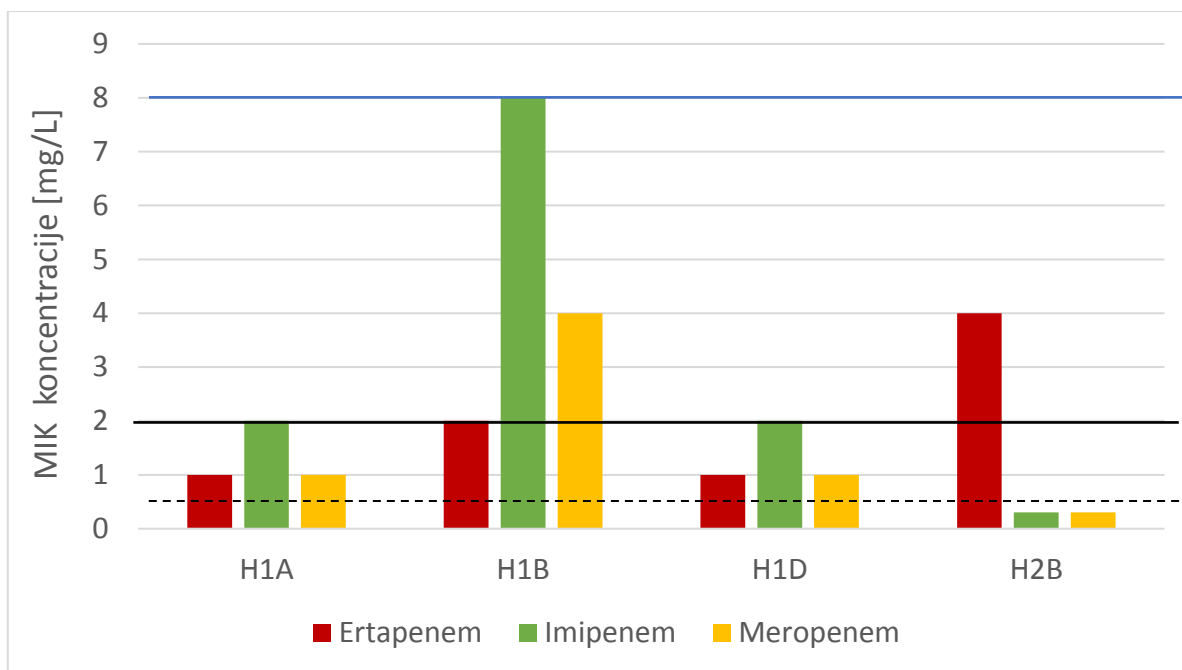
U tablici su naznačeni brojevi osjetljivih i rezistentnih transkonjuganata po antibiotiku

Kod transkonjuganata koji su metodom disk difuzije pokazali rezistentni fenotip na minimalno jedan od tri testirana karbapenema (transkonjuganti H1A, H1B, H1D i H2B), provedeno je dodatno testiranje njihove osjetljivosti na karbapeneme određivanjem MIK-a metodom mikrodilucije (slika 14) u skladu s preporukama EUCAST-a.



Slika 14. Primjer mikrotitarske pločice gdje se nakon 18 sati inkubacije na 35 °C određivala vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) tj. koncentracije pri kojoj dolazi do vidljive inhibicije rasta bakterijske kulture (nema замуćenja)(vlastita fotografija)

Na slici 15 grafički su prikazane MIK vrijednosti ertapenema, imipenema i meropenema za 4 transkonjuganta. Kao što je vidljivo na slici, svi transkonjuganti rezistentni su na ertapenem, jer su njihove MIK vrijednosti ertapenema $>0,5$ mg/L. Nasuprot tome, samo jedan transkonjugant je pokazao rezistenciju na imipenem dok su MIK-ovi imipenema za ostale transkonjugante bili ≤ 2 mg/L te se oni smatraju osjetljivim na imipenem. Svi transkonjuganti pokazali su osjetljivost na meropenem.



Slika 15. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za ertapenem, imipenem i meropenem za 4 transkonjuganta

Isprekidana linija predstavlja graničnu vrijednost osjetljivosti na ertapenem (0,5 mg/L), a puna linija graničnu vrijednost osjetljivosti na imipenem (2 mg/L). Plavom linijom prikazana je granična vrijednost osjetljivosti na meropenem (8 mg/L)

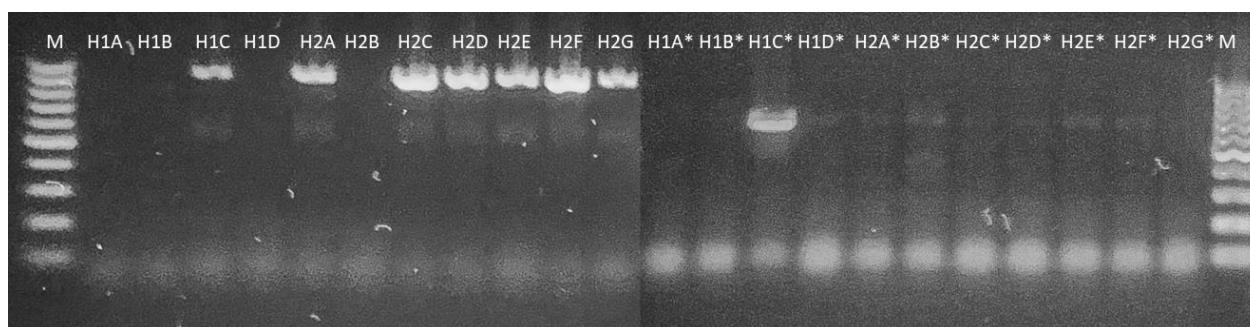
Sva četiri testirana transkonjuganta pokazala su rezistenciju samo na ertapenem, a jedan transkonjugant iz otpadne vode bolnice H1 na imipenem. Osim produkcijom karbapenemaza, ovakav fenotip u kojem je antibakterijska aktivnost ertapenema inhibirana, a imipenema i meropenema uglavnom netaknuta, može se objasniti posebnim mehanizmom posredovanim ESBL enzimima. Negativni naboj i veličina molekule ertapenema čini ovaj antibiotik vrlo osjetljivim u slučajevima promjene propusnosti vanjske membrane enterobakterija, jer dovodi do smanjenja koncentracije antibiotika unutar same stanice. U takvim uvjetima gdje je koncentracija ertapenema snižena, ESBL enzimi mogu uspješno inaktivirati ovaj antibiotik prije negoli dosegne optimalnu koncentraciju za ispoljavanje antibakterijskog djelovanja (Chung i sur., 2016).

Za svih 11 transkonjuganata određene su MIK vrijednosti kolistina. Svi transkonjuganti pokazali su osjetljivost na kolistin istom metodom mikrodilucije. Ovakav rezultat može se objasniti manjom primjenom starog antibiotika kolistina u usporedbi s ostalim antibioticima, jer se tek odnedavno ponovo koristi i to u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama koje ispoljavaju rezistenciju na karbapeneme (Tambić Andrašević i sur., 2018).

4.3. DETEKCIJA ESBL GENA I GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE NA PLAZMIDIMA

Metodama PCR-a i agarozne gel elektroforeze u svih 11 analiziranih transkonjuganata ispitana je prisutnost ukupno 14 gena za antibiotsku rezistenciju, od kojih 9 kodira za ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{SME}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} i *bla*_{CTX-M-9}), a 5 za karbapenemaze (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48}).

Na gelu prikazanom na slici 16 vidljivi su produkti umnažanja DNA s početnicama za grupu gena *bla*_{CTX-M-1} i gena *bla*_{TEM}. U jažicama označenim s H1C, H2A, H2C, H2D, H2E, H2F i H2G vidljiva je po jedna intenzivna vrpca veličine oko 900 pb što odgovara očekivanoj veličini amplikona za grupu gena *bla*_{CTX-M-1}. Nadalje, u jažici označenoj s H1C* vidljiva je intenzivna vrpca veličine oko 600 pb što odgovara očekivanoj veličini amplikona za gen *bla*_{TEM}. U jažicama H1D*, H2E* i H2F* na istoj poziciji vidljiva je slaba vrpca koja se također smatra kao pozitivan PCR produkt.



Slika 16. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata gena *bla*_{CTX-M-1} (jažice H1A-H2G) i gena *bla*_{TEM} (jažice H1A*-H2G*) na 1,5 %-tnom agaroznom gelu. M – DNA marker raspona 100-3000 pb

U svim analiziranim transkonjugantima ustanovljena je prisutnost barem jednog ESBL gena odgovornog za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije. Od ukupno 4 potvrđena transkonjuganta iz otpadne vode bolnice H1, dva su pozitivna na *bla*_{TEM}, sva četiri na *bla*_{CTX-M-1}, a niti jedan na *bla*_{GES} (tablica 9). Od ukupno 7 analiziranih transkonjuganta iz otpadne vode bolnice H2, svi su bili pozitivni na *bla*_{CTX-M-1}, 6 je bilo pozitivno na *bla*_{TEM}, a samo jedan na *bla*_{GES} (tablica 9). Valja naglasiti da je u 8 (2 iz H1 i 6 iz H2) od ukupno 11 analiziranih transkonjuganata potvrđeno postojanje dva ESBL gena.

Tablica 9. Fenotipska i molekularna karakterizacija transkonjuganata

Oznaka transkonjuganata	Geni	Inc skupina	Fenotip rezistencije
H1A	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{VIM}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP, IMP, GM
H1B	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{VIM}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, IPM
H1C	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP
H1D	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{VIM}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP
H2A	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M, colE, colE _{TP}	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP
H2B	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M i T	AMC, AML, CXM, CTX, FEP, ETP, GM
H2C	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{GES}	L/M, colE	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP
H2D	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP
H2E	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M, colE	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP
H2F	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM}	L/M, colE, colE _{TP}	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP
H2G	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, GM, CIP

AML-amoksisicilin, AMC-amoksisicilin/klavulanska kiselina, CL-cefaleksin, CXM-cefuroksim, CAZ-ceftazidim, CTX-cefotaksim, FEP-cefepim, ETP-ertapenem, IPM-imipenem, GM-gentamicin, CIP-ciprofloksacin

Prisutnost barem jednog ESBL gena na plazmidima ispitivanih transkonjuganata je u skladu s njihovim fenotipom rezistencije na cefalosporine 1.-4. generacije. Prema izvješću Europskoga centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (ECDC) iz 2015. godine, najčešći dosadašnji tipovi ESBL enzima - TEM, SHV i OXA, zamijenjeni su CTX-M tipom koji je prisutan u 5 različitih skupina koje su različito geografski zastupljene. Tako je primjerice skupina 1 uglavnom rasprostranjena u Europi što je u skladu i s rezultatima ovog istraživanja, jer je upravo *bla*_{CTX-M-1} gen (skupina 1) bio prisutan u svim transkonjugantima. Nasuprot tome, geni *bla*_{SHV} i *bla*_{OXA} nisu detektirani niti u jednom. Međutim, u većini transkonjuganata detektirana je istovremena prisutnost *bla*_{TEM} i *bla*_{CTX-M-1} gena. To upućuje na zajedničko horizontalno širenje ova dva ESBL gena među bakterijama što je zapaženo i u ranijim istraživanjima (Brolund i sur., 2014). U samo jednom transkonjugantu detektiran je gen *bla*_{GES} koji za sada ne predstavlja veliki klinički problem, jer nije pokazao sposobnost epidemijskog širenja.

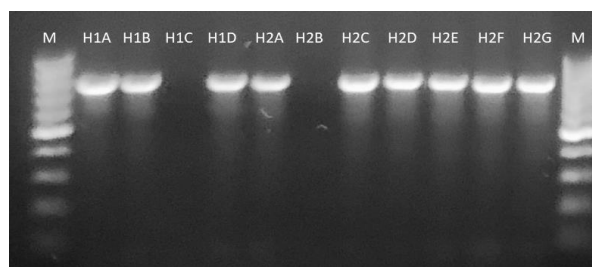
Analizom prisutnosti gena za karbapenemaze, od 11 analiziranih transkonjuganata, u samo 3 transkonjuganta porijeklom iz otpadne vode bolnice H1, potvrđena je prisutnost gena

koji kodira karbapenemazu - gena *bla_{VIM}*. Produkcija karbapenemaza smatra se najefikasnijim i dominantnim mehanizmom rezistencije na karbapeneme, a glavni pokretač širenja ovog mehanizma rezistencije je horizontalni prijenos karbapenemaznih gena (Narayanan i sur., 2016). Karbapenemaza VIM trenutno je najraširenija plazmidna metalo- β -laktamaza na svijetu (Queenan i Bush, 2007), a geni *bla_{VIM}* su često lokalizirani unutar genskih kazeta integrirani pa se vezano nasljeđuju s genima za rezistenciju na ostale skupine antibiotika, poput aminoglikozida, kloramfenikola i fluorokinolona (Kenneth i Thomson, 2010) što je potvrđeno i u ovom radu. Za razliku od transkonjuganata u kojima je detektiran gen *bla_{VIM}* i potvrđen rezistentni fenotip na karbapeneme, u transkonjugantu H2B nije detektiran gen za karbapenemazu, a potvrđen je rezistentni fenotip na ertapenem. Ovo zapažanje upućuje na pretpostavku da rezistencija na ertapenem u ovom slučaju potječe od već spomenutog mehanizma posredovanog ESBL enzimima *bla_{CTX-M-1}* i *bla_{TEM}*.

4.4. KLASIFIKACIJA PLAZMIDA PREMA SKUPINAMA INKOMPATIBILNOSTI

Klasifikacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti provedena je primjenom PBRT analize, a skupina inkompatibilnosti (Inc) uspješno utvrđena za plazmide svih 11 transkonjuganata. Kao što je vidljivo iz tablice 9, dominantna inkompatibilna skupina plazmida bila je IncL/M identificirana u 6 transkonjuganata, nakon čega slijedi IncColE u 4 transkonjuganta te IncColE_{tm} u 2 transkonjuganta. Svi plazmidi iz transkonjuganata porijeklom iz bolnice 1 pripadali su u IncL/M, dok su plazmidi iz transkonjuganata porijeklom iz bolnice 2 uvršteni u IncL/M, IncT, IncColE i IncColE_{TM} (tablica 9).

Primjer agarozne gel elektroforeze PBRT-PCR produkata za detekciju plazmida iz IncL/M skupine sa standardnim početnicama L/Mf i L/Mr (Carattoli i sur., 2005) prikazan je na slici 17. U svim jažicama, osim u jažicama označenim s H1C i H2B, vidljiva je po jedna jaka vrpca veličine oko 900 pb što odgovara očekivanoj veličini amplicona umnoženog sa standardnim početnicama za detekciju plazmida iz Inc L/M skupine (slika 17).



Slika 17. Agarozna gel elektroforeza za detekciju plazmida iz Inc L/M skupine (jažice H1A-H2G) sa standardnim početnicama (Carattoli i sur., 2005)

M – DNA marker raspona 100-3000 pb

Valja naglasiti da su u nekim transkonjugantima identificirane dvije ili tri različite inkompatibilne skupine plazmida. Tako primjerice plazmidi iz transkonjuganata H2C i H2E pripadaju dvjema Inc skupinama (IncL/M i IncColE) dok plazmidi transkonjuganata H2A i H2F čak trima (IncL/M, IncColE i IncColE_{TM}) (tablica 9). Nadalje, plazmidi transkonjuganta H2B, osim što pripadaju skupini L/M jedini pripadaju i skupini IncT.

IncL/M skupinu inkompatibilnosti čine konjugativni plazmidi velikog potencijala širenja između različitih vrsta enterobakterija te su prepoznati kao jedni od najvažnijih plazmida za širenje rezistencije na antibiotike. U istraživanju kojeg su 2015. proveli Adamczuk i suradnici, sekvenciranjem 20 plazmida iz ove skupine detektirano je 28 različitih gena koji kodiraju za β-laktamaze iz svih razreda po Ambleru. Ono što je zanimljivo, a vidljivo i na plazmidima transkonjuganata iz ovog istraživanja, jest da su svi plazmidi na kojima se nalazio gen *bla*_{TEM} imali i gen za još jedan ESBL enzim, i to *bla*_{CTX-M-1}. Osim toga, svi VIM pozitivni transkonjuganti u ovom istraživanju imali su plazmid IncL/M skupine. Veza između plazmida IncL/M skupine i gena *bla*_{VIM} također je opisana u literaturi (Bedenić i sur., 2016), a rezultati analize plazmida iz kliničkih izolata enterobakterija rezistentnih na karbapeneme porijeklom iz hrvatskih bolnica (Jelić, 2018.) potvrđuje i nadopunjuje ranije opise.

Pored IncL/M skupine, plazmidi iz 4 transkonjuganta pripadali su u IncColE, od čega su dva pripadnici podskupine IncColE_{TM}. ColE_{TP} amplifikacija je osmišljena kako bi se specifično otkrila podskupina ColE-pozitivnih plazmida koji pokazuju različitu oriV sekvencu od ostalih pripadnika skupine (74 % homologije s drugim varijantama plazmida ColE skupine), a 100% identičnu oriV sekvenci plazmida pTPqnrS-1a *Salmonelle* Typhimurium DT193 (Garcia-Fernandez i sur., 2009). Plazmidi IncColE skupine su uglavnom male veličine i nisu samokonjugativni, ali ih mogu mobilizirati ko-rezidentni konjugativni plazmidi, kroz prisutnost mobABC gena (Garcia-Fernandez i sur., 2009). Iz navedenog se može pretpostaviti da transkonjuganti koji sadrže dva plazmida (npr. H2C i H2E) koja pripadaju skupinama IncL/M i IncColE sadrže jedan konjugativni plazmid (IncL/M) i jedan (IncColE) koji je konjugirao uz pomoć konjugativne mašinerije prvog.

IncT skupinu inkompatibilnosti čine plazmidi slični prototipu Rts1, velikom konjugativnom plazmidu izvorno izoliranom iz *Proteus vulgaris* koji pokazuje pleiotropne termoosjetljive fenotipove, a na kojem su detektirani ESBL geni (Murata i sur., 2002). Jedini transkonjugant čiji plazmid je pripadao IncT skupini je transkonjugant iz otpadne vode bolnice H2, koji je još posjedovao i plazmid iz IncL/M skupine.

Iz tablice 9 je nadalje vidljivo da svi transkonjuganti imaju višestruko rezistentan fenotip tj. ispoljavaju rezistenciju na barem jedan antibiotik iz minimalno tri različite skupine antibiotika. Ta karakteristika je posljedica zajedničkog prijenosa više gena odgovornih za rezistenciju na različite skupine antibiotika koji se nalaze na istom plazmidu.

U okviru ovog rada provedeno je istraživanje čiji je fokus usmjeren na praćenje horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije između bakterija bolničkih otpadnih voda te karakterizaciju plazmida na kojima se ti geni nalaze. Rezultati fenotipskog i molekularnog testiranja transkonjuganata upućuju na to da se rezistencija na cefalosporine 3. generacije posredovana ESBL genima, poglavito *bla_{CTX-M-1}*, prenosi putem plazmida zajedno s rezistencijom na druge skupine antibiotika, uključujući fluorokinolone i aminoglikozide. Ono što zabrinjava jest to da svi transkonjuganti sadrže plazmide koji pripadaju IncL/M skupini koju su nekad činili endemski plazmidi regije Mediterana, no zbog velikog potencijala širenja, u današnje vrijeme su globalno rasprostranjeni (Potter i sur., 2016). Budući da ovi plazmidi često nose čitav spektar rezistentnih gena, imaju potencijal da doprinesu razvoju višestruko rezistentnih sojeva, uključujući i sojeve s većim potencijalom širenja, što može izazvati veće ili manje epidemije. Iako ovo istraživanje daje uvid u prirodu mobilnih plazmida koji nose ESBL gene, za bolje razumijevanje spomenutih plazmida potrebna je daljnja detaljna analiza, poput sekvenciranja cijelih plazmida.

5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom metode egzogene izolacije plazmida, uspješno je proveden plazmidni prijenos gena za rezistenciju na cefalosporine 3. generacije iz bakterija bolničkih otpadnih voda u modelni patogen *E. coli* CV601. Frekvencija transkonjugacije za otpadnu vodu bolnice H1 iznosila je $1,50 \cdot 10^{-7}$, a za otpadnu vodu bolnice H2 $7,37 \cdot 10^{-8}$
2. Dobiveno je 11 transkonjuganata kojima je metodama disk difuzije i mikrodilucije ustanovljen višestruko rezistentan fenotip.
3. Molekularnim metodama (PCR i gel elektroforeza) utvrđeno je da plazmidi svih 11 transkonjuganata sadrže minimalno jedan ESBL gen. Gen *bla_{CTX-M-1}* detektiran je u svim transkonjugantima, a drugi po učestalosti bio je *bla_{TEM}*.
4. Osim ESBL gena, molekularnim metodama utvrđena je prisutnost gena za karbapenemaze *bla_{VIM}* na plazmidima tri transkonjuganta.
5. Na temelju PBRT analize plazmidi su svrstani u 4 skupine inkompatibilnosti: IncL/M, IncColE, IncColEtm i IncT, pri čemu je dominantna skupina bila IncL/M.
6. Nepročišćene bolničke otpadne vode predstavljaju rizik za javno zdravlje budući da sadrže ESBL-producirajuće plazmide koji imaju širok raspon bakterijskih domaćina i nose višestruku rezistenciju pa mogu pridonijeti stvaranju i širenju višestruko rezistentnih patogena.

6. LITERATURA

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* **8**, 251–259.

Andrašević S, Vranić-Ladavac M, Tambić Andrašević A (2009) Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki Glasnik* **29**, 171–176.

Baraniak A, Fiett J, Mrówka A, Walory J, Hryniewicz W, Gniadkowski M (2005) Evolution of TEM-type extended-spectrum β -lactamases in clinical Enterobacteriaceae strains in Poland. *Antimicrob Agents Ch* **49**, 1872–1880.

Basu J, Chattopadhyay R, Kundu M, Chakrabarti P (1992) Purification and partial characterization of a penicillin-binding protein from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **174**, 4829–4832.

Bedenić B, Firis N, Elveđi-Gašparović V, Krilanović M, Matanović K, Štimac I, i sur. (2016) Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a long-term care facility in Croatia. *Wien klin Wochenschr* **128**, 404–413.

Bennett PN, Brown MJ (2003) *Clinical pharmacology*, 9. izd. Edinburgh: Elsevier.

Bielen A, Šimatović A, Kosić-Vukšić J, Senta I, Ahel M, Babić S, i sur. (2017) Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Res* **126**, 79–87.

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**, 42–51.

Bonnet R (2004) Growing group of extended-spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Ch* **48**, 1–14.

Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**, 933–951.

Branger C, Ledda A, Billard-Pomares T, Doublet B, Fouteau S, Barbe V, i sur. (2018) Extended-spectrum β -lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia*

coli plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microb Genom* **4**, e000203.

Brolund A, Edquist PJ, Mäkitalo B, Olsson-Liljequist B, Söderblom T, Tegmark Wisell K, i sur. (2014) Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. *Clin Microbiol Infec* **20**, 344–352.

Bubonja-Šonje M, Abram M (2014) Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Medicina Fluminensis* **50**, 128-149.

Bush K, Bradford PA (2016) β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *CSH Perspect Med* **6**, a025247.

Carattoli A (2013) Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* **303**, 298–304.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Meth* **63**, 219–228.

Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN (2014) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* **22**, 686–696.

Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, i sur. (1991) Enterobacter bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* **115**, 585–590.

Chung HS, Yong D, Lee M (2016) Mechanisms of ertapenem resistance in Enterobacteriaceae isolates in a tertiary university hospital. *J Invest Med* **64**, 1042–1049.

Colodner R (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am J Infect Control* **33**, 104–107.

Cushnie TPT, O'Driscoll NH, Lamb AJ (2016) Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* **73**, 4471–4492.

- Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM (1997) OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Ch* **41**, 785–790.
- De Rosa M, Verdino A, Soriente A, Marabotti A (2021) The odd couple(s): An overview of beta-lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group. *Int J Mol Sci* **22**, 617.
- Džidić S, Šušković J, Kos B (2007) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* **46**, 11–21.
- El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A (2017) Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem* **131**, 185–195.
- Fernandes R, Amador P, Prudêncio C (2013) β -Lactams. *Rev Med Microbiol* **24**, 7–17.
- Francetić I (2015) Farmakoterapijski priručnik, 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada.
- García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A (2009) Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella. *J Antimicrob Chemoth* **63**, 274–281.
- Garzone P, Lyon J, Yu VL (1983) Third-generation and investigational cephalosporins: I. structure-activity relationships and pharmacokinetic review. *Drug Intel Clin Phar* **17**, 507–515.
- Georgopapadakou, N, Hammarstrom S, Strominger JL (1977) Isolation of the penicillin-binding peptide from D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. *P Natl Acad Sci Usa* **74**, 1009–1012.
- Gonzales PR, Pesesky MW, Bouley R, Ballard A, Biddy BA, Suckow MA, i sur. (2015) Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nat Chem Biol* **11**, 855–861.
- González, M, Brito, N, Hernández-Bolaños, E & González, C (2019) New tools for high-throughput expression of fungal secretory proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Microb Biotechnol* **12**, 1139–1153.

Hultman J, Tamminen M, Pärnänen K, Cairns J, Karkman A, Virta M (2018) Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS Microbiol Ecol* **94**, fiy038.

Jelić M (2018) Mehanizmi rezistencije na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme (doktorski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, i sur. (2015) Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci* **16**, 9654–9692.

Kardos N (2020) CRE (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae) and the globalization of antimicrobial resistance: Problems and solutions. *SunText Review of BioTechnology* **1**, 103.

Kenneth S, Thomson KS (2010) Extended spectrum β -lactamase, AmpC and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* **48**, 1019-1025.

Kotłowski R, Grecka K, Kot B, Szweda P (2020) New approaches for Escherichia coli genotyping. *Pathogens* **9**, 73.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a pseudomonas aeruginosa vlinical isolate. *Antimicrob Agents Ch* **43**, 1584–1590.

Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D (2016) A Review of SHV extended-spectrum β -lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol* **7**, 1374.

Livermore DM (1998) Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemoth* **41**, 25–41.

Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, i sur. (2012) Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemoth* **67**, 1569–1577.

Martin LA, Fox RTV, Baldwin BC, Connerton IF (1992) Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in *Botrytis Cinerea*. *Brit Crop Prot Conf Pest Dis* **1**, 207-214.

- Martínez-Martínez L, González-López JJ (2014) Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infec Micr Cl* **32**, 4–9.
- Milaković M, Vestergaard G, González-Plaza JJ, Petrić I, Šimatović A, Senta I, i sur. (2019) Pollution from azithromycin-manufacturing promotes macrolide-resistance gene propagation and induces spatial and seasonal bacterial community shifts in receiving river sediments. *Environ Int* **123**, 501–511.
- Murata T, Ohnishi M, Ara T, Kaneko J, Han CG, Li YF, i sur. (2002) Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: Implications for evolution of large plasmid genomes. *J Bacteriol* **184**, 3194–3202.
- Naas T, Nordmann P (1997) OXA-type beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 785–90.
- Narayanan N, Johnson L, MacDougall C (2016) Beyond susceptible and resistant, part III: Treatment of infections due to gram-negative organisms producing carbapenemases. *J Pediatr Pharmacol Ther* **21**, 110–119.
- Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP (2008) The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* **28**, 235–249.
- Nicolau DP (2008) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. *Clin Infect Dis* **47**, 32–40.
- Nordmann P, Poirel L (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* **20**, 821–830.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriae. *Emerg Infect Dis* **17**, 1791–1798.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R (1993) Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* **37**, 962–969.
- O'Neill E, Humphreys H, Phillips J, Smyth EG (2005) Third-generation cephalosporin resistance among gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients:

Significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemoth* **57**, 356–359.

Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-Lopez C, Kumarasiri M, Lastochkin E, i sur. (2013) How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *P Natl Acad Sci Usa* **110**, 16808–16813.

Paladino JA, Sunderlin JL, Singer ME, Adelman MH, Schentag JJ (2008) Influence of extended-spectrum β -lactams on gram-negative bacterial resistance. *Am J Health-Syst Ph* **65**, 1154–1159.

Paredes Páliz KP, Cunachi AM, Cruz LO, Arias F (2019) Antibiotic resistance of Enterobacteria present in an urban wastewater treatment plants: A public health problem. *Adv Environ Biol* **13**, 25–33.

Pandey N, Cascella M (2020) Beta lactam antibiotics. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Ch* **55**, 4943–4960.

Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657–686.

Paterson DL (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* **119**, 20–28.

Pitout JD, Laupland KB (2008) Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**, 159–166.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 622–632.

Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Ch* **48**, 15–22.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**, 119–123.

Potter RF, D'Souza AW, Dantas G (2016) The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Update* **29**, 30–46.

Queenan AM, Bush K (2007) Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**, 440–458.

Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY (2013) First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int J Infect Dis* **17**, 1255–1258.

Reygaert WC (2011) Ceftobiprole: An emerging therapeutic option for resistant and complicated infections. *Clin Med Insights Ther* **3**, 57–66.

Sabtu N, Enoch DA, Brown NM (2015) Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Brit Med Bull* **116**, 105–113.

Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. (2002) Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 161–168.

Sanders CC, Sanders WE (1992) Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* **15**, 824–839.

Sardelić S, Benedić B (2009) Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki Glasnik* **29**, 177–183.

Smyth C, O'Flaherty A, Walsh F, Do TT (2020) Antibiotic resistant and extended-spectrum β -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. *Environ Pollut* **262**, 114244.

Stocco G, Lucafò M, Decorti G. (2020). Pharmacogenomics of Antibiotics. *Int J Mol Sci* **21**, 5975.

Tambić Andrašević A, Lucić S, Tambić T (2018) Antibiotic resistance in Croatia. *Medicina Fluminensis* **54**, 312–321.

Tambić Andrašević A, Žmak Lj, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelec D, Bukovski S, i sur. (2020) Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2019. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske.

Tambić Andrašević A, Žmak Lj, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelec D, Bukovski S, i sur. (2021) Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske.

Tansey EM, Reynolds LA (2000) *Post penicillin antibiotics: From acceptance to resistance?* London: Wellcome Trust.

Thomas CM, Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711–721.

Tomić Paradžik M, Drenjančević D, Presečki-Stanko A, Kopic J, Talapko J, Zarfel G, Bedenić B (2019) Hidden carbapenem resistance in OXA-48 and extended-spectrum β -lactamase-positive *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* **25**, 696–702.

Tonkić M (2006) Molekularna karakterizacija sojeva *Escherichia coli* koji luče β -laktamaze proširenog spektra izoliranih u dječjoj i odrasloj populaciji (doktorska disertacija), Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split.

Vahaboglu H, Dodanlı S, Eroglu C, Oztürk R, Soyletir G, Yildirim I, Avkan V (1996) Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* stains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol* **34**, 2942–2946.

Vranić-Ladavac M, Bošnjak Z, Bader N, Barišić N, Kalenić S, Bedenić B (2010) Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol* **59**, 1069–1078.

Wang Y, Wu J, Cao Y (2015) The extended spectrum β -lactamases (ESBL) and virulence genes of intestinal enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in healthy elderly individuals. *Int J Clin Exp Med* **8**, 20953–20958.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch* **35**, 147–151.

Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H (2008) Bacterial resistance to antimicrobials. Boca Raton, FL: Crc Press.

Zheng B, Xu H, Guo L, Yu X, Ji J, Ying C, i sur. (2020) Genomic and phenotypic diversity of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from bacteremia in China: A multicenter epidemiological, microbiological, and genetic study. *Engineering*, **12**.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Gulan izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis