

# Identifikacija plazmida koji kodiraju karbapenemazu KPC-2 kod Enterobacteriaceae iz okoliša

---

**Bellulovich, Ema**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:225663>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Odjel za biologiju

Ema Bellulovich

**IDENTIFIKACIJA PLAZMIDA KOJI KODIRAJU  
KARBAPENEMAZU KPC-2 KOD *ENTEROBACTERIACEAE* IZ  
OKOLIŠA**

Diplomski rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Odjel za biologiju

Ema Bellulovich

**IDENTIFIKACIJA PLAZMIDA KOJI KODIRAJU  
KARBAPENEMAZU KPC-2 KOD *ENTEROBACTERIACEAE* IZ  
OKOLIŠA**

Diplomski rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

# IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam diplomski rad s naslovom

## **IDENTIFIKACIJA PLAZMIDA KOJI KODIRAJU KARBAPENEMAZU KPC-2 KOD *ENTEROBACTERIACEAE* IZ OKOLIŠA**

izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Ema Bellulovich

## ZAHVALA

Prije svega, posebno se zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Ivici Šamaniću na svom prenesenom znanju, strpljenju i posvećenom vremenu. Hvala od srca što ste uvijek podržavali moje ideje, uvijek bili neizmijerna podrška te mi otvorili vrata za sve ono što me čeka u budućnosti.

Posebno hvala i izv. prof. dr. sc. Ani Maravić na posvećenom vremenu, na svojoj pomoći i podršci koju ste mi uvijek pružali. Također na mikrobiološkim uzorcima, vremenu provedenom u laboratoriju i savjetima. Veliko hvala na znanju koje ste mi prenijeli i na ukazanom povjerenju.

Hvala i doktorandici Miji Dželaliji na divnim satima rada u laboratoriju, strpljenju, podršci i svemu što ste me naučili.

Zahvaljujem se i profesoru Mirku Ruščiću na naučenom metodičkom znanju i svim savjetima koji nastavu čine zanimljivom!

Također, moje zahvale idu svima koji su doprinijeli pisanju ovog znanstveno-istraživačkog rada, profesorima i profesoricama koji/koje su oblikovali i širili moje znanje.

Iako riječi ne mogu opisati zahvalnost i ljubav prema vama, posebno hvala mojoj obitelji! Hvala na svemu što ste mi omogućili i pružili u životu, hvala na neizmijernoj ljubavi, toplini i vjeri u mene. Bez vas ne bih bila ono što jesam!

Naposlijetku, hvala mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i koji su satima slušali znanstvene činjenice koje ne razumiju. Hvala na ljubavi i podršci!

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Studij: Biologija i kemija

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

### IDENTIFIKACIJA PLAZMIDA KOJI KODIRAJU KARBAPENEMAZU KPC-2 KOD *ENTEROBACTERIACEAE* IZ OKOLIŠA

Ema Bellulovich

#### SAŽETAK

Pojava rezistentnih sojeva *Enterobacteriaceae* posljedica je nerijetke uporabe karbapenemskih antibiotika u kliničkoj praksi. Karbapenemaze hidroliziraju karbapenemske antibiotike, a geni koji ih kodiraju su povezani s visokorizičnim klonovima i šire se horizontalnim prijenosom pomoću plazmida. Cilj ovog istraživanja bio je identificirati plazmide koji kodiraju KPC-2 kod *Enterobacteriaceae* iz okoliša. Od 30 izolata u kojima je sekvencioniranjem utvrđena prisutnost *bla<sub>KPC</sub>* gena u njih 18 utvrđen je njihov položaj na plazmidima. Plazmidi koji kodiraju *bla<sub>KPC-2</sub>* gen veličine su od 33.3 kb do 160 kb, među kojima su neki od njih već prethodno identificirani u bolničkom okruženju te otpadnim vodama u Hrvatskoj što ukazuje na njihovu diseminaciju u prirodni okoliš. Bitno je također istaknuti da KPC-producirajući sojevi nisu do sada izolirani iz morske vode s javne plaže u Hrvatskoj što ukazuje na mogući javnozdravstveni problem olakšanog širenja među ljudskom populacijom i potrebu za daljnjim istraživanjem njihove rasprostranjenosti u okolišu.

**Ključne riječi:** *bla<sub>KPC</sub>* gen, karbapenemaza-producirajuće *Enterobacteriaceae*, morski okoliš, obalne vode, rezistencija na karbapeneme

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 62 + VII stranica, 15 grafičkih prikaza, 8 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Dr. sc. Ana Maravić, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., asistentica na projektu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad prihvaćen: **rujan, 2022.**

## Basic documentation card

University of Split

Graduating thesis

Faculty of Science

Study: Biology and chemistry

Department of biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### IDENTIFICATION OF CARBAPENEMASE KPC-2 ENCODING PLASMIDS AMONG ENVIRONMENTAL ENTEROBACTERIACEAE

Ema Bellulovich

#### ABSTRACT

The emergence of resistant *Enterobacteriaceae* strains is a consequence of the not so rare use of carbapenems in clinical practice. Carbapenemases hydrolyse carbapenems, while KPC encoding genes are associated with high-risk clones and spread through horizontal transmission. The aim of this study was to identify the plasmids encoding the KPC-2 in environmental *Enterobacteriaceae*. In 18 out of 30 *bla*<sub>KPC</sub>-positive isolates their position on plasmids was determined. Plasmids encoding the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene range from 33.3 kb to 160 kb, among which some of them have already been identified in the hospital environment and wastewaters in Croatia, indicating their dissemination into the natural environment. It is important to note that KPC-producing strains have not yet been isolated from seawater from a public beach in Croatia which may present a public health risk due to easier spreading among the human population, as well as the need for further investigation of their distribution in the environment.

**Key words:** *bla*<sub>KPC</sub> gene, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, carbapenem resistance, coastal waters, marine environment

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

**Thesis consists of:** 62 + VII pages, 15 figures, 8 tables and 24 references

Original language: Croatian

**Mentor:** Ilica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

**Reviewers:** Ilica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Ana Maravić, Ph.D. Associate Professor of Faculty of Science, University of Split

Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem, Project assistant of Faculty of Science, University of Split

Thesis accepted: September 2022.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Opće značajke bakterija iz porodice <i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	1
<b>1.1.1 Morfologija</b> .....	1
<b>1.1.2 Metabolizam i biokemijske značajke</b> .....	1
<b>1.1.3 Struktura i kliničko značenje</b> .....	2
<b>1.1.4 Klinički značajni rodovi <i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	4
<b>1.2. Karbapenemi</b> .....	6
<b>1.2.1 Otkriće i struktura karbapenemskih antibiotika</b> .....	6
<b>1.2.2. Mehanizam djelovanja karbapenema</b> .....	8
<b>1.2.3. Klinički značaj</b> .....	8
<b>1.2 Rezistencija enterobakterija na karbapeneme</b> .....	9
<b>1.3.1 Rezistencija na karbapeneme posredovana proizvodnjom karbapenemaza</b> .....	12
<b>1.3.2 Rezistencija na karbapeneme posredovana drugim mehanizmima</b> .....	13
<b>1.4 Klasifikacija karbapenemaza</b> .....	14
<b>1.4.1 Karbapenemaze Amblerove klase A</b> .....	14
<b>1.4.2. Karbapenemaze Amblerove klase B, C i D</b> .....	15
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
<b>2.1 Podrijetlo <i>bla</i><sub>KPC</sub>-pozitivnih bakterijskih izolata</b> .....	17
<b>2.1.1 Uzorkovanje i analiza morske i riječne vode</b> .....	17
<b>2.2.2 Identifikacija bakterija i određivanje fenotipske osjetljivosti na antibiotike</b> .....	18
<b>2.2 Identifikacija <i>bla</i><sub>KPC</sub> gena</b> .....	20
<b>2.3 Probir CRE izolata od interesa</b> .....	20

2.3.1 Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) nakon razgradnje ukupne bakterijske DNA S1 nukleazom .....	22
2.3.2. Southern hibridizacijska analiza.....	26
3. REZULTATI.....	36
3.1. Identifikacija plazmida koji nose <i>bla<sub>KPC</sub></i> gen .....	36
4. RASPRAVA.....	40
5. ZAKLJUČAK .....	47
6. METODIČKI DIO.....	48
POPIS SLIKA .....	58
POPIS TABLICA.....	60
POPIS LITERATURE .....	61
SKRAĆENICE:.....	63



# 1. UVOD

## 1.1 Opće značajke bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* pripada domeni *Bacteria*, koljenu *Proteobacteria*, razredu *Gammaproteobacteria* te redu *Enterobacteriales* te obuhvaća velik broj heterogenih gram-negativnih bakterija. Komenzali su probavnog sustava čovjeka gdje čine 1-2 % ukupne normalne crijevne flore<sup>1</sup>, ali i kralježnjaka, gmazova i insekata. Porodica *Enterobacteriaceae* zastupljena je i u okolišu odnosno u tlu, vodi i biljnim organizmima. Danas je poznato oko 50 rodova i 150 vrsta, no tridesetak vrsta odgovorno je za bolesti čovjeka<sup>2</sup>. Uz stafilokoke i streptokoke, enterobakterije su najčešći uzročnici bakterijskih infekcija čovjeka<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Morfologija

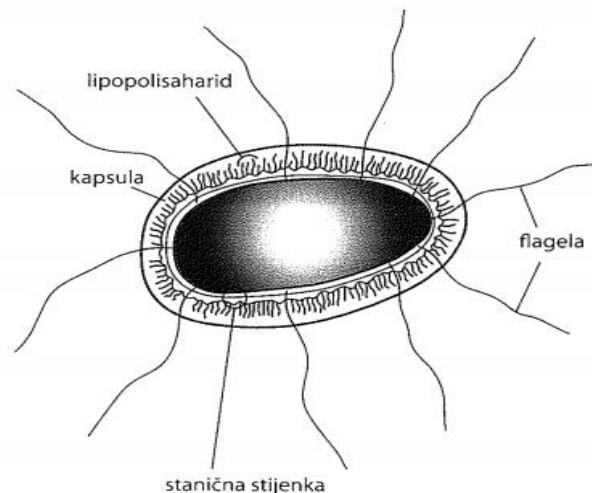
Porodicu *Enterobacteriaceae* karakteriziraju bakterije štapićastog oblika- bacili i kokobacili, duljine od 2 do 6  $\mu\text{m}$ , a širine od 0,5 do 0,7  $\mu\text{m}$ <sup>1</sup>. Većina ih je pokretna zbog peritriho smještenih flagela, no ima i nepokretnih predstavnika te sve posjeduju fimbrije. Kako pripadaju gram negativnim bakterijama imaju i vanjsku i unutarnju membranu, a neke vrste imaju jasno izraženu kapsulu. Dobro rastu na osnovnim i selektivnim podlogama (MacConkey, SS i XLD agar). Na osnovnim hranjivim podlogama kolonije su velike, glatke, sjajne i sivog pigmenta, a na selektivnim podlogama boja kolonija varira.

### 1.1.2 Metabolizam i biokemijske značajke

Fakultativni su anaerobi, ne produciraju spore te dobro preživljavaju nepovoljne uvjete odnosno vrlo su otporne na vanjske uvjete. Niske temperature i vlažnost pogoduju njihovom rastu i omogućuju njihovo preživljavanje mjesecima. Optimalna temperatura rasta i razmnožavanja iznosi 37 °C.<sup>1</sup> Metabolički su vrlo aktivne te se determiniraju po različitim biokemijskim značajkama. Karakteristične su po tome da fermentativno razgrađuju ugljikohidrate ili koriste Krebsov ciklus trikarbonskih kiselina. Porodicu *Enterobacteriaceae* karakterizira razgradnja glukoze do kiseline, redukcija nitrata i ne mogućnost lučenja oksidaze tj. oksidaza su negativne.

### 1.1.3 Struktura i kliničko značenje

Tri su temeljna antigena porodice *Enterobacteriaceae*- O antigen ili antigen stanične stijenke, H-antigen ili antigen bičeva i K-antigen ili kapsularni antigen. O antigen ili somatski antigen je lipopolisaharid i sastavni je dio stanične stijenke gram negativnih bakterija. Građen je od tri dijela koji su međusobno spojeni. Vanjski dio čini postranični lanac oligosaharida koji je zaslužan za antigensku specifičnost vrste tj. serotip. U srednjem dijelu nalazi se polisaharid koji je varijabilan između rodova u porodici *Enterobacteriaceae*. Unutarnji dio čini lipid A koji povezuje LPS s peptidoglikanskim kompleksom i čije masne kiseline djeluju kao endotoksin. O-antigen je termostabilan te se detektira aglutinacijom. Protutijela ovog antigena često su IgM tipa<sup>1</sup>. H- antigen prisutan je u pokretnih rodova i građen je od proteina flagelina te mu aminokiselinski slijed određuje visoku antigensku specifičnost. K- antigen također nije prisutan u svih rodova već samo kod inkapsuliranih predstavnika. Kapsula može biti jasno izražena negativnim bojanjem, primjerice kod roda *Klebsiella*, a u drugim rodovima uočljiv je zbog nemogućnosti dokaza O-antigena hiperimunim serumima<sup>1</sup>. K- antigen po kemijskom sastavu je uglavnom polisaharid međutim ima i proteinskih komponentni (*E. coli*, *Salmonella*).



**Slika 1.** Shematski prikaz antigenske strukture bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*<sup>1</sup>.

Patogenost ove porodice jedan je od globalnih problema današnjice. Činitelji patogenosti enterobakterija jesu brojni činitelji kolonizacije, činitelji invazivnosti, endotoksin, enterotoksin, citotoksini, hemolizini, siderofore i antimikrobna rezistencija koja će biti opisana u posebnom poglavlju. Činitelji kolonizacije su adhezini (fimbrije, kapsula ili LPS) i imaju značajnu ulogu u kolonizaciji bakterije na ciljnu stanicu. Činitelji invazivnosti su površinski proteini ili enzimi poput kinaza i fosfataza koji razaraju stanice. Endotoksin tj. lipid A imaju svi sojevi, a odgovoran je za vrućicu, trombocitopeniju, leukopeniju, septički šok i diseminiranu intravaskularnu koagulaciju. Enterotoksini unutar ove porodice djeluju na epitel stanica crijeva te uzrokuju sekreciju elektrolita u lumen crijeva i dijareju. Citotoksini oštećuju stanice sisavaca, a hemolizini djeluju na eritrocite i leukocite. Siderofore omogućuju bakterijama da unesu ione željeza u stanice kako bi preživjele u tkivima i tjelesnim tekućinama čovjeka.

Primarno patogene bakterije prenose se feko-oralno (kontaminirana hrana i voda) pa su opće higijenske mjere i higijenske mjere u proizvodnji hrane glavni način zaštite od infekcija.

Infekcije koje uzrokuju mogu biti endogene i egzogene te se dijele u dvije skupine crijevne infekcije i infekcije izvan crijevnog sustava. Za crijevne infekcije odgovorni su rodovi *Salmonella*, *Shigella*, neki serotipovi *E. coli* i *Yersinia enterocolitica*. Infekcije izvan crijevnog sustava najčešće podrazumijevaju infekcije mokraćnog sustava, intraabdominalne infekcije, sepse, meningitis, infekcije kirurških rana ili pneumonije. *Yersinia pestis* uzrokuje kugu koja se ne može klasificirati niti u jednu prethodno navedenu skupinu. Laboratorijska dijagnostika infekcija relativno je jednostavna zbog olakšanog rasta ove porodice, no zahtjeva raznovrsne testove osjetljivosti zbog rastućeg trenda rezistencije na antibiotike<sup>1</sup>.

#### 1.1.4 Klinički značajni rodovi *Enterobacteriaceae*

Klinički značajni rodovi porodice *Enterobacteriaceae* dijele se u dvije skupine: pravi i oportunistički patogeni. Pravi patogeni obuhvaćaju neke serotipove *E. coli* te tu spadaju i *Salmonella* sp., *Shigella* sp. i *Yersinia* sp. Oportunistički patogeni jesu *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp. i *Morganella* sp.

Rod *Escherichia* obuhvaća gram-negativne pokretne bacile. Neki sojevi imaju jače izraženu kapsulu, a svi su asporogeni i fakultativno anaerobni. Najznačajniji predstavnici roda su: *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* i *E. vulneris* među kojima je *E. coli* najvažniji humani patogen. Istu je prvi izolirao Escherich 1885. godine iz stolice djece<sup>1</sup>. Komenzal je crijeva ljudi i životinja. Pripadnici vrste su štapići duljine 2-6 µm, većina ih je pokretna s peritrihijalnim flagelama<sup>2</sup>. *E. coli* pokazuje dobar rast i na običnim hranjivim podlogama i stvara okrugle, konveksne i glatke kolonije te je laktoza pozitivna. Biokemijska identifikacija vrste je sljedeća: oksidaza negativna, glukoza pozitivna, H<sub>2</sub>S negativna i plin pozitivna. Antigenska struktura obuhvaća preko 50 H-antigena, oko 100 K-antigena i preko 160 različitih O-antigena<sup>2</sup>. *E. coli* uzrokuje crijevne infekcije, infekcije mokraćnih puteva te neonatalni meningitis i sepsu. Prema navedenom razlikujemo četiri skupine crijevnih patogena- enteropatogene (EPEC), enterotoksične (ETEC), enteroinvazivne (EIEC) i enterohemoragične (EHEC) *E. coli*. Za oko 80% infekcija mokraćnog sustava odgovorne su uropatogene *E. coli* čiji su činitelji virulencije kapsula, adhezini, siderofore, endotoksin  $\alpha$  i  $\beta$  hemolizini<sup>1</sup>. Isti proizvode faktore virulencije specifične za svaki patotip, koji su kodirani bakteriofazima, na plazmidima ili na dijelovima kromosoma (otoci patogenosti). Usporedbe potpuno sekvencioniranih genoma nepatogenih i patogenih sojeva pokazuju da je veličina genoma *E. coli* približno 5000 gena<sup>2</sup>.

Rod *Shigella* karakteriziraju gram-negativni nepokretni bacili bez kapsule. Također su asporogeni i fakultativni anaerobi. Četiri su značajne vrste: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* i *S. sonnei*, a uzročnici su bacilarne dizenterije. Uzgoj podrazumijeva i obične i selektivne podloge, a kolonije su oblika slova S, bezbojne i laktoza negativne. Biokemijska obilježja ovog roda jesu: oksidaza negativna, glukoza pozitivna, H<sub>2</sub>S negativna i plin negativna. Prema građi O-antigena i biokemijskim obilježjima dijele se u četiri seroskupine s 40-tak serotipova<sup>1</sup>. Vrste iz roda *Shigella*

vrlo su infektivne, čak manje od 200 stanica dovoljno je za razvoj infekcije, a činitelji patogenosti su egzotoksin „SHIGA toksin“, proteini vanjske opne, enzimi te endotoksin.

Rod *Salmonella* jesu gram negativni pokretni bacili. Ne stvaraju spore te su fakultativni anaerobi. Genetičkom analizom utvrđene su dvije vrste *S. enterica* i *S. bongori*. Kolonije su sive, male, konveksne i glatke te laktoza negativne. Biokemijska obilježja su: oksidaza negativna, glukoza pozitivna, H<sub>2</sub>S pozitivna i plin negativna. Na temelju antigene strukture postoji 2435 serotipova<sup>1</sup>, a najznačajniji je uzročnik trbušnog tifusa *S. enterica* serotip *Typhi*. Rasprostranjenost uključuje okoliš te probavni sustav životinja, gmazova, ptica i insekata. Na temelju O-antigena podijeljene su u 67 grupa od kojih su klinički najznačajnije označene slovima od A do E. Činitelji patogenosti roda *Salmonella* jesu adhezini, Vi antigen, sekrecijski sustav, lipid A, enterotoksini i citotoksini.

Rod *Klebsiella* podrazumijeva nepokretne bacile s jasno izraženom kapsulom. Ne stvaraju spore i fakultativno su anaerobni. Istraživanjem genoma otkrivene su četiri značajne vrste *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, međutim klinički značaj imaju i dvije podvrste *K. pneumoniae* subsp. *ozenae* i *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Laktoza su pozitivne, stvaraju velike, mukozne i sjajne kolonije. Biokemijskom identifikacijom utvrđeno je da su oksidaza negativne, glukoza pozitivne, H<sub>2</sub>S negativne i plin pozitivne. *K. pneumoniae* najznačajnija je vrsta koja uzrokuje infekcije dišnog i mokraćnog sustava, meningitis i sepsu. Međutim, izvor većine infekcija uzrokovana *K. pneumoniae* jesu bolnice i/ili se javljaju kod pacijenata s oslabljenim osnovnim stanjima. Komenzal je probavnog sustava čovjeka i životinja, međutim nalazi se i na sluznici nazofarinksa te u prirodi.

Članovi roda *Citrobacter* nazvani su po svojoj sposobnosti korištenja citrata kao jedinog izvora ugljika. Prirodno se nalaze u humanom i životinjskom probavnom sustavu te u prirodi. Najčešći uzročnici bolničkih infekcija jesu *C. freundii* i *C. koseri* i *C. amalonaticus* te su odgovorni za intraabdominalne infekcije, infekcije mekog tkiva i osteomijelitis, infekcije kod pacijenata s kateterom i slično<sup>2</sup>.

Rod *Enterobacter* obuhvaća *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sakazakii* i *E. asburiae*. Ove bakterije fermentiraju laktozu, pokretne su i stvaraju mukoidne kolonije. Sojevi obično proizlaze iz endogene crijevne flore hospitaliziranih bolesnika ili se šire od pacijenta do pacijenta. Infekcije su nerijetke u bolesnika koji su primali antimikrobnu terapiju i u bolesnika na jedinici intenzivnog liječenja. *Enterobacter* spp. može uzrokovati široku paletu bolničkih infekcije, uključujući upalu



pluća, mokraćne infekcije, infekcije rana i opekлина, infekcije protetskih uređaja te meningitis<sup>2</sup>. Komenzali su probavnog sustava i čovjeka i životinja, no nalaze se i u okolišu.

## 1.2. Karbapenemi

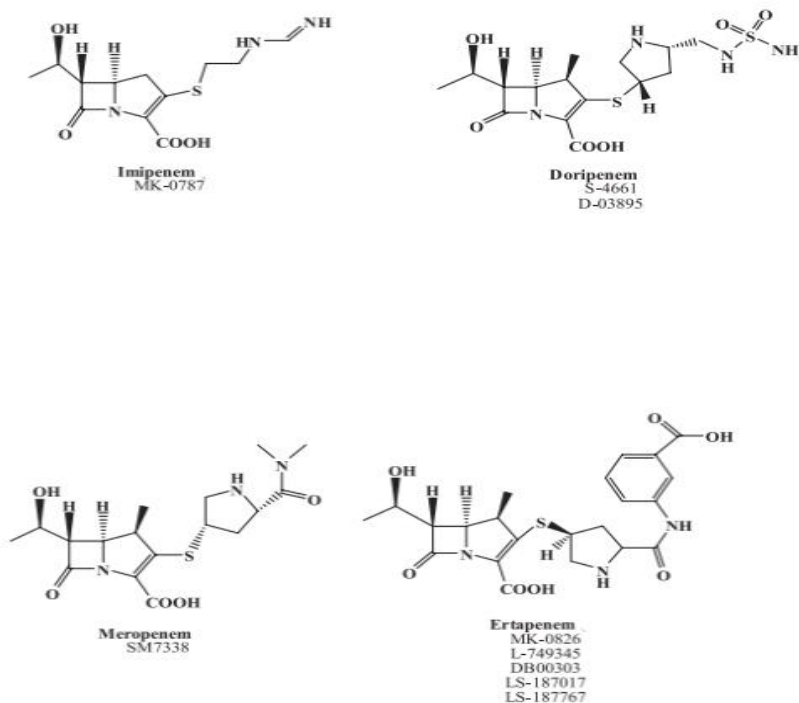
Karbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem) spadaju u beta-laktamske antibiotike (djeluju na sintezu bakterijske stanične stijenke) širokog spektra te su smatrani „prvom linijom obrane“ protiv infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama.

### 1.2.1 Otkriće i struktura karbapenemskih antibiotika

1960. godina, pojavom  $\beta$ -laktamaza rasla je i bakterijska rezistencija na peniciline i znanstvenici počinju tragati za inhibitorima istih koje uspješno otkrivaju 1967. godine<sup>3</sup>. Prvi potencijalni inhibitor bile su olivanske kiseline koje proizvodi *Streptomyces clavuligerus*<sup>3</sup>. Iste obilježava karbapenemska okosnica, no radi kemijske nestabilnosti i neefikasnog prodiranja u bakterijsku stanicu nisu bile pogodne za kliničku upotrebu. Nedugo nakon, uslijedilo je otkriće klavulanske kiseline iz bakterije *Streptomyces clavuligerus* i tienamicina iz bakterije *Streptomyces cattleya*<sup>3</sup> koji je danas ishodišna struktura svih karbapenemskih antibiotika.

Pojam karbapenem karakterizira fuzirani 4:5 laktam penicilina koji sadrži dvostruku vezu, između drugog i trećeg atoma ugljika međutim supstituiran je prvi ugljikov atom, atomom sumpora<sup>3</sup>. Suprotno od ostalih  $\beta$ -laktamskih antibiotika, transkonfiguracija hidroksietil postraničnog lanca nalazi se na poziciji šest što osigurava stabilnost  $\beta$ -laktamaza te isti ne sadrže atom kisika ili sumpora u bicikličkoj jezgri<sup>1</sup>. Navedeno je prvi puta predstavljeno znanstvenoj zajednici 1967. godine na 16. konferenciji ICAAC (*Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*)<sup>3</sup>. Iako je tienamicin „prirodni spoj“ zbog slabog prinosa prilikom purifikacijskog procesa danas se proizvodi sintetičkim putem i karbapenemi su po svom kemijskom sastavu semisintetički derivati tienamicina. Saznanje da je tienamicin nestabilan u vodenim otopinama, osjetljiv na baznu hidrolizu (pH veći od 8)<sup>3</sup> i izrazito reaktivan u dodiru s nukleofilima, dovodi do sinteze derivata tienamicina, odnosno derivata N-formimidola- imipenema i srodnog panipenema. 1985. godine imipenem je postao prvi karbapenem za liječenje težih oblika bakterijskih infekcija<sup>3</sup>.

I imipenem i panipenem osjetljivi su na dehidropeptidazu I (humani bubrežni enzim) stoga je nužna bila primjena s dodatnim inhibitorima kao što su cilastatin i betamipron<sup>3</sup>. Veliki napredak u ovome “sintetičkom putovanju” bilo je dodavanje metilne skupine na 1-β položaj koja je odgovorna za prevenciju hidrolize uzrokovane dehidropeptidazom I<sup>3</sup>. U potrazi za stabilnijim i djelotvornijim antibioticima u sljedeća dva desetljeća razvijaju se danas dostupni meropenem, ertapenem i doripenem.



**Slika 2.** Kemijska struktura imipenema, doripenema, meropenema i ertapenema<sup>3</sup>.

### 1.2.2. Mehanizam djelovanja karbapenema

Karbapenemi prodiru kroz bakterijsku membranu gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija preko proteina porina odnosno proteina vanjske membrane, prolaze periplazmatski prostor i trajno acetiliraju penicilin vezujuće proteine tj. PBP proteine (engl. *Penicillin-binding proteins*). PBP proteini odgovorni su za katalizu sinteze peptidoglikanskog sloja. Glikanska okosnica formira desno zavijeni heliks s periodičnošću od tri okreta po zavojnici. Karbapenemi djeluju kao mehanički inhibitori peptidazne domene PBP-a i inhibiraju umrežavanje peptida kao i druge reakcije u kojima sudjeluje enzim peptidaza. Ključni čimbenik učinkovitosti je njihova sposobnost da se vežu na više različitih penicilin vezujućih proteina. Budući da je formiranje stanične stijenke dinamičan i “trodimenzionalni proces” u kojem se formiranje i autoliza odvijaju istovremeno, kada su PBP inhibirani, autoliza se nastavlja, peptidoglikan slabi i posljedično tome stanica puca zbog velikog osmotskog tlaka.

### 1.2.3. Klinički značaj

Karbapenemski antibiotici danas imaju najširi spektar djelovanja od svih poznatih antibiotika i efikasno djeluju na gram-pozitivne koke, većinu enterobakterija, uključujući i one koje su rezistentne na ostale  $\beta$ -laktamske antibiotike te na nefermentivne bakterije. Imipenem i meropenem koriste se prvenstveno za liječenje umjereno do teških bolničkih i polimikrobnih infekcija, uključujući intraabdominalne infekcije, bolničke pneumonije, septicemije i febrilne neutropenije<sup>4</sup>. Meropenem ima ključnu ulogu u borbi protiv infekcija uzrokovanih sljedećim bakterijama: *Streptococcus* spp., MSSA, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacterales* (uključujući ESBL, *extended spectrum  $\beta$ -lactamases*), *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp<sup>5</sup>. Kombinacija meropenema i vaborbaktama koristi se protiv nekoliko KPC-producirajućih sojeva. Imipenem je poznati karbapenemski antibiotik sa širokim spektrom djelovanja i samostalnom stabilnošću protiv brojnih beta-laktamaza, uključujući ESBL. Imipenem/cilistatin kompleks koristi se protiv AmpC i KPC koji proizvode *Enterobacterales* i *P. aeruginosa*<sup>5</sup>. Imipenem pokazuje efikasniju *in vitro* aktivnost protiv gram-pozitivnih patogena, dok meropenem ima snažnije *in vitro* djelovanje protiv gram-negativnih patogena, uključujući *P. aeruginosa*. U usporedbi s ostalim karbapenemskim

antibioticima, ertapenem pokazuje smanjenu aktivnost protiv bolničkih infekcija povezanih s *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp. i *P. aeruginosa*, međutim u kombinaciji s drugim inhibitorima  $\beta$ -laktamaza ertapenem ima efikasnu učinkovitost u liječenju kompliciranih intraabdominalnih infekcija, akutnih infekcija zdjelice, infekcija na mjestu kirurškog zahvata, pneumonije, infekcija mokraćnog sustava i dijabetičkog stopala<sup>4</sup>. Doripenem najviše nalikuje meropenemu, osim njegove povećane *in vitro* aktivnosti protiv *P. aeruginosa*. Indiciran je za bolesnike s intraabdominalnim i mokraćnim infekcijama uključujući pijelonefritis<sup>4</sup>.

## 1.2 Rezistencija enterobakterija na karbapeneme

Otpornost na karbapeneme u gram-negativnih bakterija izazvala je globalnu epidemiju koja poprima sve veće razmjere. Iako su *Enterobacteriaceae* koje proizvode karbapenemazu dobile najveću pozornost jer je prvo uočena njihova patogenost početkom 1990.-ih godina, značajne su i nefermentirajuće gram-negativne bakterije.

Porast infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje proizvode  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra, ESBL dovela je do velikog rasta korištenja karbapenema kao antibiotika posljednje linije obrane od infekcije. Nakon toga, u Sjedinjenim Američkim Državama su se pojavili otporni sojevi *Klebsiella pneumoniae* koji nose prenosive gene za karbapenemaze smještene na plazmidima<sup>6</sup>. Rezistencija enterobakterija ostala je sporadična sve do početka trećeg milenija zbog neizmjereno brzog širenja višestruko otpornih sojeva *K. pneumoniae* (engl. *multi drug resistant*, MDR).

Iako su podaci ograničeni za određene regije, opus bolesti uzrokovane patogenima rezistentnim na karbapeneme je sličan u većini regija (npr. Azija, indijski kontinent, Europa, Sjeverna Amerika i Latinska Amerika), s time da nefermentirajuće bakterije su najproblematičniji patogeni, a zatim slijede CRE (engl. *Carbapenem-resistant Enterobacterales*) izolati. Stope rezistencije na karbapenem za nefermentore često su veće od 60%, a za fermentirajuće bakterije iznose oko 10%<sup>7</sup>.

Prema podacima iz 2019. godine 82, 3% svih infekcija otpornih na karbapenem uzrokovano je *A. baumannii* ili *P. aeruginosa*, dok je 17, 7% uzrokovano *K. pneumoniae* ili *E. coli*<sup>7</sup>. Otpornost na karbapeneme razlikuju se i ovisno o mjestu infekcije- stope za *P. aeruginosa* i *A. baumannii* su niže kod infekcija krvotoka nego respiratornih infekcija. *S. maltophilia* koja je intrinzički otporna

na karbapeneme najčešće se javlja kod hospitaliziranih pacijenata s nozokomijalnom pneumonijom u Aziji, Europi i Sjevernoj Americi. Japansko bolničko izvješće o praćenju infekcija (JANIS) 2016. godine, koje uključuje 1653 ustanove, navodi da su stope rezistencije imipenema i meropenema, (granične točke prema CLSI 2012) bile 0, 1% i 0, 2% za *E. coli*, 0, 2% i 0, 5% za *K. pneumoniae*, 17, 9% i 12, 3% za *P. aeruginosa* i 3, 1% i 1, 9% za vrste *Acinetobacter*<sup>7</sup>. Europski multicentrični COMBACTE nadzor je opsežan program koji prikuplja informacije o metodologiji koja se koristi za otkrivanje mehanizama rezistencije na karbapenem kao i stope rezistencije, koje određuju i CLSI i EUCAST prijelomne točke. U proteklih nekoliko godina javlja se sve više bakterijskih izolata otpornih na karbapeneme, a posljedično tome i veći porast težeg i bolnijeg liječenja pacijenata i rast mortaliteta u bolnicama diljem svijeta. Podaci Europske mreže za nadzor otpornosti na antimikrobna sredstva (EARS-net) ukazuju na značajno povećanje trendova otpornosti na karbapenem u *K. pneumoniae* u Europskoj uniji između 2015. i 2019. godine<sup>8</sup>. Rezistencija na karbapenem ostala je rijetka kod *E. coli*, ali isto je uočeno povećanje između 2015. i 2019. godine<sup>8</sup>. U Hrvatskoj je, također, sve više CRE izolata pronađeno i prijavljeno u bolnicama zbog brzog širenja porodice *Enterobacteriaceae* koje proizvode KPC<sup>9</sup>. Složenost cjelokupnog problema leži u upotrebi različitih karbapenemskih antibiotika u bolnicama, razlikama u prijelomnim točkama osjetljivosti, neadekvatnoj razini kontrole infekcije te niskoj dostupnosti brzih dijagnostičkih metoda za olakšavanje otkrivanja i liječenja bolesnika zaraženih patogenima rezistentnima na karbapeneme. Shodno tome, prisutno je širenje proizvođača karbapenemaza (OXA-23) u *A. baumannii*, uglavnom kod pacijenata hospitaliziranih u jedinici intenzivne njege. Vrste karbapenemaza u *Enterobacteriaceae* su više varijabilne, s trendom širenja KPC proizvođača u bolničkim patogenima, a najčešće je to u *K. pneumoniae* te širenje proizvođača OXA-48 i NDM u *Enterobacteriaceae* stečenim u zajednici (uglavnom *E. coli*), osobito u Europi. Sve dok bolnice nemaju bolje brze dijagnostičke metode, kliničari bi se trebali koristiti nacionalnim studijama nadzora, regionalnim bazama podataka i lokalnim podacima o osjetljivosti na razini bolnice i odjela koji će im pomoći u vođenju odluke o liječenju antibioticima kada su njihovi pacijenti zaraženi patogenom otpornim na karbapeneme. Terapiju za CRE infekcije treba individualizirati i temeljiti na molekularnim fenotipovima rezistencije, profilima osjetljivosti, težini bolesti i karakteristikama bolesnika<sup>10</sup>. Potrebna su kvalitetnija ispitivanja kako bi se usmjerilo učinkovito liječenje infekcija uzrokovanih CRE izolatima.

Zbog svega navedenog, 2017. godine WHO (*World Health Organization*) objavljuje globalnu listu prioritetnih patogena te rangira *Enterobacteriaceae* otporne na karbapenem (CRE), *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* u kategoriju najvišeg prioriteta (engl. *critical*) kako bi se razvila svijest i aktivno tražilo rješenje ovog globalnog problema.

**Tablica 1.** WHO globalna lista prioritetnih patogena, 2017.godina. (preuzeto s <https://www.who.int/>)

PRIORITET 1: KRITIČAN	<i>Acinetobacter baumannii</i> , rezistencija na karbapeneme
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , rezistencija na karbapeneme
	<i>Enterobacteriaceae</i> , rezistencija na karbapeneme
PRIORITET 2: VISOK	<i>Enterococcus faecium</i> , vankomicin rezistentne
	<i>Staphylococcus aureus</i> , meticilin i vankomicin rezistentne
	<i>Helicobacter pylori</i> , klaritromicin rezistentne
	<i>Campylobacter</i> spp., rezistencija na fluorokinolone
	<i>Salmonella</i> , rezistencija na fluorokinolone
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , rezistencija na cefalosporine i fluorokinolone
PRIORITET 3: SREDNJE	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicilin rezistentne
	<i>Haemophilus influenzae</i> , ampicilin rezistentne
	<i>Shigella</i> spp., rezistencija na fluorokinolone

### 1.3.1 Rezistencija na karbapeneme posredovana proizvodnjom karbapenemaza

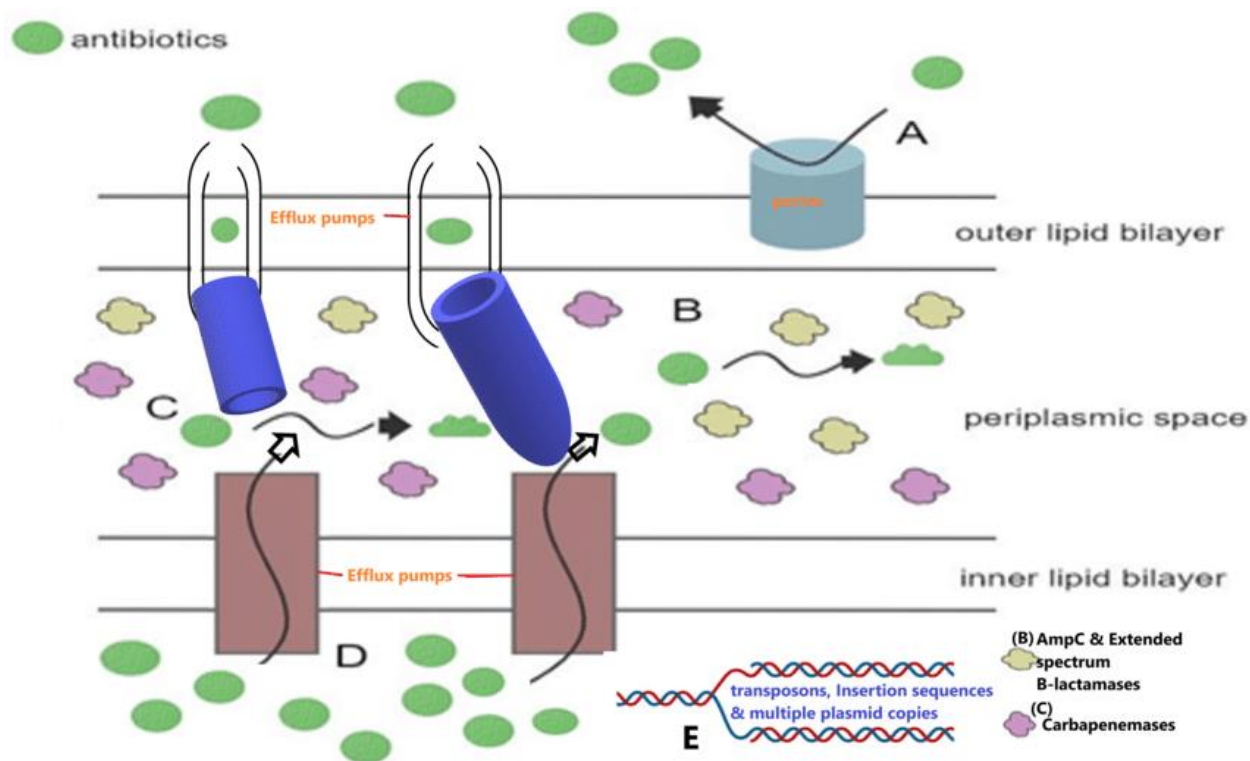
Mehanizmi rezistencije na karbapeneme uključuju proizvodnju  $\beta$ -laktamaza, promjene u efluks pumpama i mutacije koje mijenjaju ekspresiju i/ili funkciju porina i PBP-a.<sup>3</sup> Kako bi se znatno umanjilo trajanje hospitalizacija i/ili vrijeme provedeno u jedinici intenzivne njege ključan je odabir najprikladnije antibiotske terapije u ranoj fazi liječenja gram-negativnih infekcija što se postiže određivanjem mehanizama otpornosti na karbapeneme<sup>7</sup>.

$\beta$ -laktamaze su periplazmatski enzimi koji hidroliziraju  $\beta$ -laktamske antibiotike, sprječavajući lijek da djeluje na PBP te ujedno i glavni mehanizam otpornosti. Laktamaze klase B koriste cinkov kation za inaktivaciju  $\beta$ -laktama, a svi pripadaju karbapenemazema<sup>3</sup>. Klase A, C i D koriste serin kao nukleofil za hidrolizu  $\beta$ -laktamske veze<sup>3</sup>. Sve veći broj karbapenemaza klase A (npr. KPC i GES enzimi), metalo- $\beta$ -laktamaze klase B (npr. VIM, IMP i NDM) i karbapenemaze klase D (npr. OXA-23,24/40, 48, 51, 55, 58 i 143) uzrokuju infekcije koje se teško liječe. Osim toga, prekomjerna proizvodnja laktamaze klase C, kao što su CMY-10 i PDC, koje nisu robusne karbapenemaze, dovode do rezistencije na karbapenem, osobito u kombinaciji s drugim mehanizmima.

Karbapenemaze su složena skupina kromosomski kodiranih  $\beta$ -laktamaza koje odlikuje izražajna genska raznolikost te imaju sposobnost inaktivacije gotovo svih  $\beta$ -laktamskih antibiotika, uključujući i karbapeneme. Geni za karbapenemaze smješteni su na plazmidima ili integronima zajedno s genima koji kodiraju rezistenciju na ostale razrede antibiotika naprimjer na kinolone i aminoglikozide što značajno smanjuje izbor antibiotika za liječenje infekcija<sup>6</sup>. Shodno tome, karbapenemaza-producirajući sojevi *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i *K. pneumoniae*, postaju višestruko otporni na tri ili više različitih skupina antibiotika uz globalni problem prodora sojeva rezistentnih na sve dostupne antibiotike (engl. *pandrug-resistant*). Karbapenemaze jesu problem u kliničkoj praksi zbog široke raznolikosti enzima, mogućnosti horizontalnog prijenosa gena rezistencije među različitim bakterijama te zbog čestog smještaja *bla* gena koji kodiraju karbapenemaze na prenosivim genskim elementima. Zbog svega navedenog infekcije uzrokovane ovim sojevima nerijetko se javljaju u obliku epidemija u bolnicama, staračkim domovima te ustanovama za palijativnu skrb<sup>6</sup>. Utvrđeno da je najčešće *K. pneumoniae* odgovorna za širenje ESBL gena u zdravstvenim ustanovama tijekom posljednjih 30 godina<sup>11</sup>.

### 1.3.2 Rezistencija na karbapeneme posredovana drugim mehanizmima

Neenzimski mehanizmi rezistencije na karbapeneme uključuju gubitak ekspresije gena koji kodiraju porine, mutacije u porinskim genima (OprD) i prekomjernu ekspresiju gena koji kodiraju efluks pumpe (npr. MexAB-OprM, MexXY-OprM ili MexCD-OprJ)<sup>7</sup>. Porini su nespecifični kanali u vanjskoj membrani gram-negativnih bakterija koji omogućavaju pasivni prijenos malih hidrofilnih molekula, hranjivih tvari i nekih antibiotika. Gubitak porina i prekomjerna ekspresija gena za efluks pumpe doprinosi unakrsnoj rezistenciji i na druge  $\beta$ -laktame. Unutar porodice *Enterobacteriaceae*, vrste *Proteus*, *Providencia* i *Morganella morganii* imaju intrinzičnu otpornost na imipenem<sup>7</sup> (CRE). Otpornost na karbapenemske antibiotike također se može pripisati mutacijama ili modifikacijama koje mijenjaju razinu proizvodnje ili afinitet vezanja proteina koji vežu penicilin, što je opaženo u vrsta *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii*<sup>7</sup>.



Slika 3. Mehanizam rezistencije na karbapeneme<sup>12</sup>.



## 1.4 Klasifikacija karbapenemaza

Karbapenemaze pripadaju Amblerovim molekularnim razredima  $\beta$ -laktamaza A, B, C i D<sup>6</sup>. Molekularna klasifikacija temelji se na usporedbi nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci enzima<sup>6</sup>. Također, postoji starija funkcionalna klasifikacija po Bush-u koja se temelji na supstratu kojeg hidroliziraju i tvari koje iste inhibira<sup>6</sup>. Najviši stupanj otpornosti na karbapeneme pokazuju metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL) razreda B koje su najčešće prisutne u vrsti *P. aeruginosa*, a kodirane su prenosivim genskim elementima. Danas je vidljiv porast enterobakterija, posebno sojeva *K. pneumoniae*, sa stečenim genima za karbapenemaze od kojih su najčešći su MBL, VIM i IMP te KPC enzimi razreda A.

### 1.4.1 Karbapenemaze Amblerove klase A

Karbapenemaze Amblerove klase A jesu serinske karbapenemaze jer se u njihovom u aktivnom mjestu enzima nalazi aminokiselina serin. Hidroliziraju peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aztreonam<sup>6</sup>. Inhibicija je moguća klavulanskom kiselinom i tazobaktamom<sup>6</sup>. U ovu klasu spadaju: SME (engl. *Serratia marcescens enzyme*), KPC (engl. *K. pneumoniae carbapenemase*), NmcA/IMI (engl. *not metalloenzyme carbapenemase/imipenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase*), GES (engl. Guiana extended-spectrum), SHV-38 (engl. *sulphydryl variable*) i SFC-1 (*S. fonticola*)<sup>6</sup>. Geni koji ih kodiraju nalaze se ili na kromosomskoj ili na plazmidnoj DNA. Veći dio karbapenemaza razreda A pripada porodici *Enterobacteriaceae* osim GES i KPC karbapenemaza koje su rasprostranjene među pseudomonasima i u acinetobakteru<sup>6</sup>. S kliničkog i epidemiološkog aspekta najvažnija je KPC karbapenemaza. Danas je ista globalan problem, posebno KPC iz vrste *Klebsiella pneumoniae* sa širokim spektrom plazmida odgovornih za neosjetljivost na više lijekova i, što je još važnije, za horizontalni prijenos *bla<sub>KPC</sub>* gena. Isti se često nalazi u obliku kompozitnog transpozona Tn4401 koji može varirati ovisno o dužini uz zadržavanje sličnog sadržaja gena<sup>13</sup>. Do uspješnog širenja KPC-a došlo je prvenstveno zbog širenja izolata *K. pneumoniae* koji pripadaju uspješnom klonalnom kompleksu 258 (CC258) ili ST258 (klasa I i II), utvrđenom u bolničkim i okolišnim izolatima<sup>13</sup>. KPC producirajući sojevi najčešće uzrokuju sustavne bolesti, a jedan su od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. KPC enzim ima smanjenu osjetljivost na sve beta-laktame

odnosno sposoban je hidrolizirati sve beta-laktame uključujući i karbapeneme. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) imipenema iznosi od 1 mg/l do > 64 mg/l.<sup>6</sup> Od svih karbapenema ertapenem pokazuje najslabiji antimikrobni učinak<sup>6</sup>. Prva skupina A karbapenemaza pronađena u Hrvatskoj bila je KPC-2 identificirana u soju *K. pneumoniae* u Sveučilišnom bolničkom centru u Zagrebu početkom 2011. godine<sup>14</sup>. SME-1 je kromosomski kodirana karbapenemaza opisana 1994. godine u dva soja *S. marcescens*<sup>6</sup>. Sojevi koji luče SME-1, SME-2 i SME-3 sporadično uzrokuju infekcije što je posljedica toga da se SME lokus nalazi na kromosomu te da su sojevi osjetljivi na neke cefalosporine<sup>6</sup>. NmcA i IMI karbapenemaze jesu vrlo homologne, točnije 97% aminokiselina im je zajedničko i izolirane su iz sojeva *Enterobacter cloacae*<sup>6</sup>. NmcA i IMI pronađene su sporadično u kliničkim izolatima enterobakterija te u okolišu. Prvi GES izolat *K. pneumoniae* pronađen je 1998. godine u Francuskoj, a najčešće se nalaze u pseudomonasa i enterobakterija. SFC-1 izoliran je iz *S. fonticola* pronađene u okolišu u Portugalu, a SHV-38 iz kliničkog izolata *K. pneumoniae* u Francuskoj te se geni za oba nalaze na kromosomskoj DNA<sup>6</sup>.

#### 1.4.2. Karbapenemaze Amblerove klase B, C i D

Karbapenemaze razreda B jesu MBL čiji enzim u aktivnom mjestu ima cink. Inhibicija je moguća uz pomoć kelatora metalnih iona<sup>6</sup>. Hidroliziraju sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme<sup>6</sup>. Pronalazimo ih u fermentirajućim i nefermentirajućim gram-negativnim bacilima. Karbapenemaze ovog razreda jesu: NDM (engl. *New Delhi metallo-β-lactamase*), VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*), IMP (engl. *imipenemase*), SPM (engl. *Sao Paulo metallo-β-lactamase*), SIM (engl. *Seoul imipenemase*), GIM (engl. *German imipenemase*), AIM (engl. *Adelaide imipenemase*), DIM (engl. *Dutch imipenemase*), KHM (*C. freundii* strain KHM243 – Kyorin Hospital MBL), SMB (engl. *Serratia MBL*), TMB (*Tripoli MBL*) i FIM (engl. *Florence imipenemase*)<sup>6</sup>. VIM-1 je prvi put izoliran u Italiji 1997. godine iz *P. aeruginosa*, a sojevi su bili odgovorni za epidemije bolničkih infekcija u Italiji<sup>6</sup>. *bla*<sub>VIM</sub> geni su smješteni na mobilnim genskim dijelovima što za posljedicu ima potencijal za ekspresiju i diseminaciju u gram-negativnih bakterija.

Za karbapenemaze molekularnog razreda C značajna je CMY-10 (engl. *cephamycinase activity*) koja samostalno dovodi do smanjenja djelotvornosti karbapenema.

Karbapenemaze molekularnog razreda D jesu oksacilinaze. Proširene su među nefermentirajućim gram-negativnim bacilima i enterobakterijama. Značajne karbapenemaze u acinetobaktera su: OXA-23, OXA-40, OXA-51 i OXA-58. OXA-48 oksacilinaze se javljaju u enterobakterijama, a OXA-198 je prisutna u pseudomonasu<sup>6</sup>.

## 2. MATERIJALI I METODE

Istraživanje provedeno u sklopu ovog diplomskog rada dio je istraživačke aktivnosti uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost po nazivom "*Sezonska i prostorna raspodjela gena rezistencije na antibiotike u morskim mikrobnim zajednicama duž trofičkog gradijenta u srednjem Jadranu (ARGAS)*" (broj projekta: UIP-2019-04-9778).

### 2.1 Podrijetlo *bla*<sub>KPC</sub>-pozitivnih bakterijskih izolata

#### 2.1.1 Uzorkovanje i analiza morske i riječne vode

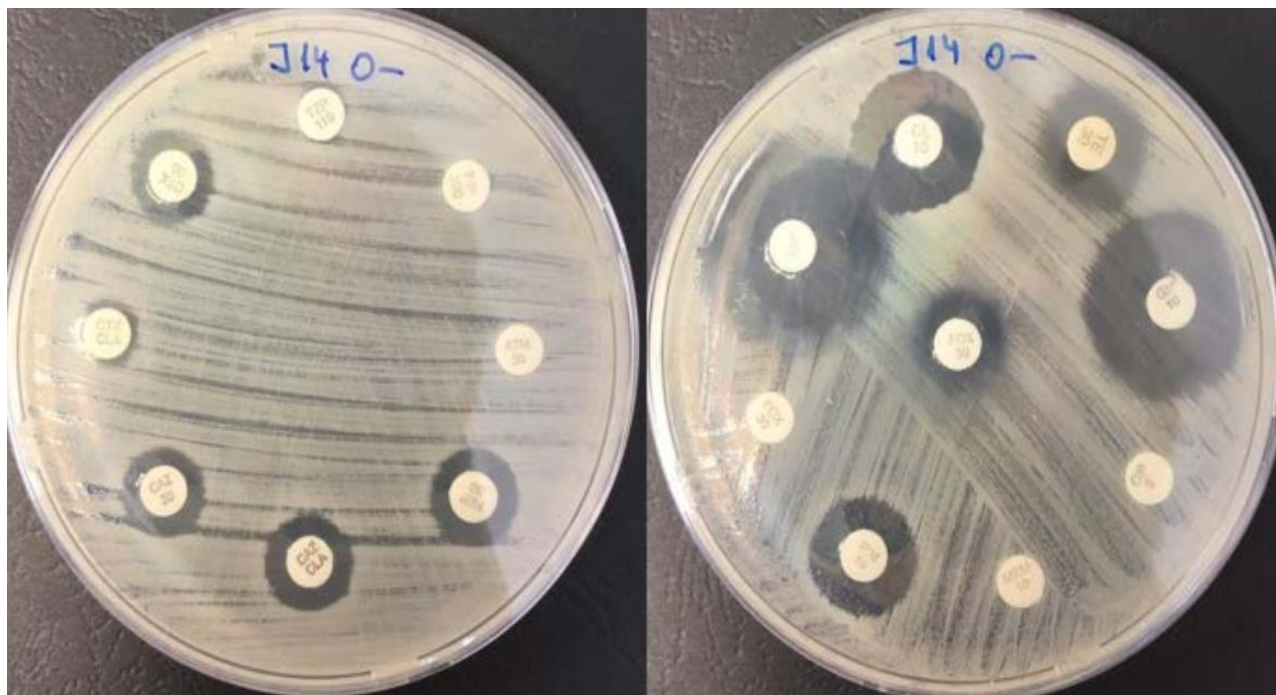
*Bla*<sub>KPC</sub>-pozitivni bakterijski izolati sakupljeni su u sklopu istraživanja sa tri postaje: plaža Trstenik, Kaštelanski zaljev i ušće rijeke Jadro. Uzorci su sakupljeni s postaja koje predstavljaju raznovrstan antropogeni utjecaj i karakteriziraju ih različiti biološki i fizikalno-kemijski parametri<sup>15</sup>. Plaža Trstenik je odabrana kao obalna postaja zbog njezinog javnozdravstvenog značaja budući da se radi o javnoj šljunčanoj plaži s velikim brojem kupaca i rekreacijskih sadržaja u ljetnom periodu. Nadalje, obalne vode Kaštelanskog zaljeva identificirane su prethodno kao spremnik oportunističkih patogenih bakterija koje karakterizira rezistencija na različite skupine antibiotika te je uzorkovanje odrađeno na sredini Kaštelanskog zaljeva<sup>9</sup>. Postaja na ušću rijeke Jadra u Kaštelanski zaljev odabrana je s ciljem istraživanja utjecaja rijeke Jadro na morske mikrobnе zajednice<sup>15</sup>. Uzorci su sakupljeni u ožujku 2021. godine istraživačkim brodom Bios Dva<sup>15</sup>. Ukupno je uzeto 10 uzoraka morske vode s površine mora i donjeg sloja vodenog stupca, a sakupili su ih Mia Dželalija (Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu) i dr. sc. Slaven Jozić (Institut za oceanografiju i ribarstvo Split)<sup>15</sup>.

Uzorcima morske vode određena je temperatura i salinitet sa SeaBird 25 CTD profilerom te koncentracija otopljenog anorganskog hranjiva. Uzorci su zatim prefiltrirani, pohranjeni na temperaturi od -20 °C i kolorimetrijski analizirani s QuAAtro Seal Analytical kontinuiranim protočnim segmentiranim analizatorom prema Hansenu i Koroleffu<sup>15</sup>. Metodom mebranske filtracije i brojenjem indikatorskih bakterija fekalnih koliforma (*E. coli*) (ISO 9308-1) i fekalnih enterokoka (ISO 7899-1) utvrđen je antropogeni utjecaj te razina fekalnog onečišćenja.

## 2.2.2 Identifikacija bakterija i određivanje fenotipske osjetljivosti na antibiotike

100 µl morske i riječne vode su u triplikatu nanoseni na ploče Marine agara (BD Difco, SAD) i triptikaza soja agara (TSA; Biolife)<sup>15</sup>. Također, metodom membranske filtracije filtrirani su alikvoti morske i riječne vode kroz celulozne membrane pora 0.22 µm<sup>15</sup>. Potom su membrane stavljene na iste agare s dodatkom antibiotika cefotaksim, sulfametoksazol, azitromicin, tetraciklin i gentamicin. Nakon inkubacije od 5 do 7 dana na 28 °C utvrđen je broj kolonija<sup>15</sup>. Broj poraslih kolonija (CFU) rezistentnih bakterija na antibiotike po ml vode podijeljen je s ukupnim brojem bakterija (CFU) za svaki uzorak kako bi se izračunala učestalost bakterija rezistentnih na pojedini antibiotik<sup>15</sup>. Zatim su s ciljem dobivanja čiste bakterijske kulture pojedinačne kolonije primoizolirane na TSA ili MacConkey (Biolife) agaru<sup>15</sup>. Izvršen je test oksidaze te identifikacija izolata MALDI-TOF MS tehnologijom (engl. *Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) upotrebom Microflex LT masenog spektrometra i MALDI-Biotyper 4.1.80 (PYTH) verzije programa (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka).

Metodom disk-difuzije na Mueller-Hinton agaru (MH, Biolife) prema protokolu (EUCAST, 2020) ispitana je fenotipska osjetljivost izolata. Čista bakterijska kultura uzeta je jednokratnom mikrobiološkom ezom i suspendirana u 0.85%-tnu fiziološku otopinu natrijeva klorida (NaCl) vorteks mješalicom<sup>15</sup>. Densitometrom DEN-1 (Biosan, Litva) je utvrđena bakterijska suspenzija gustoće 0.5 McFarlanda. Ista je inokulirana na sobnoj temperaturi na ploči s MH agarom. Nakon petnaest minuta na nasijane ploče dispensorom su postavljeni papirnati diskovi antibiotika (BD Difco, SAD) promjera 6 mm (EUCAST, 2020)<sup>15</sup>. Također, prema protokolu (EUCAST, 2020) ispitana je osjetljivost izolata na antibiotike za detekciju Ampc β-laktamaza<sup>15</sup>.



**Slika 4.** Metodom disk-difuzije određen antibiogram vrste *K. pneumoniae* (foto: Nora Ballarin).

Za ovaj diplomski rad uzeti su izolati rezistenti na imipenem i/ili meropenem, a pripadaju sljedećim vrstama: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter freundii* i *Escherichia coli*.

## 2.2 Identifikacija *bla<sub>KPC</sub>* gena

Genomska DNA bakterija izolirana je korištenjem NucleoSpin Microbial DNA kita (Macherey-Nagel, UK) prema uputama proizvođača te skladištena pri temperaturi od -20°C. Regija veličine 798 pb *bla<sub>KPC</sub>* gena umnožena je početnicama KPC-Fm CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG i KPC-Rm CTTGTCATCCTTGTTAGGCG, prema sljedećim uvjetima<sup>16</sup>. Dva µL ukupne bakterijske DNA umnožene su multipleksnom PCR reakcijom (engl. *Multiplex PCR technique*) u reakcijskoj smjesi od 50 µL. Reakcijska smjesa za detekciju gena *bla<sub>KPC</sub>* sadrži 1 X PCR pufer (10 mmol/L Tris-HCl [pH 8,3], 50 mmol/L KCl), 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mmol/L svakog deoksinukleozidnog trifosfata, 10 µmol/L svake početnice i 2 U AmpliTaq Gold polimeraze (Roche, Meylan, Francuska). Amplifikacija je provedena uz sljedeće uvjete: 10 min na 94°C i 36 ciklusa amplifikacije koji se sastoje od 30 sekundi na 94°C, 40 sekundi na 52°C i 50 sekundi na 72°C te 5 minuta na 72°C. DNA fragmenti su analizirani elektroforezom na 2% agaroznom gelu na 100 V tijekom 1 h u otopini 1 X TAE pufera koji sadrži 0,05 mg/L etidijevog bromida<sup>16</sup>.

## 2.3 Probir CRE izolata od interesa

Ukupno 37 karbapenamaza-pozitivnih izolata uključeno je u istraživanje s ciljem identifikacije plazmida koji kodiraju karbapenemazu KPC kod porodice *Enterobacteriace*. Kod 30 izolata uspješno je identificiran *bla<sub>KPC</sub>* gen, kod 6 izolata *bla<sub>KPC+VIM</sub>* dok je 1 izolat bio pozitivan samo na *bla<sub>VIM</sub>* gen. Daljnje istraživanje u cilju identifikacije plazmida uključilo je 30 izolata kod kojih je identificiran *bla<sub>KPC</sub>* gen. Radilo se o ukupno 12 izolata *K. pneumoniae*, 1 izolat *K. oxtoca*, 3 izolata *Raoultella ornithinolytica*, 2 izolata *Enterobacter bugandensis*, 1 izolat *Enterobacter cloacae*, 5 izolata *Citrobacter freundii* i 6 izolata *Escherichia coli*. Probrani izolati višestruko su rezistentni na antibiotike te su PCR-om detektirani i drugi geni rezistencije na antibiotike te isti jesu globalni zdravstveni problem čije rješenje je primarni zadatak znanstvene zajednice u smislu razvijanja novih antibiotika i otkrivanja molekularno genetičke pozadine mehanizama rezistencije.

**Tablica 2.** Lista ukupnih izolata kod kojih je identificiran *blaKPC* gen.

			<b>KPC (793 bp)</b>
<b>Broj izolata u PCR eksperimentima</b>	<b>ID izolata</b>	<b>Bakterijska vrsta</b>	
1	J14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
2	KZ69	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+
3	KZ72	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+
4	KZ74	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+
5	T200	<i>Enterobacter bugandensis</i>	+
6	J204	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
7	T205	<i>Escherichia coli</i>	+
8	T206	<i>Escherichia coli</i>	+
9	T207	<i>Citrobacter freundii</i>	+
10	T208	<i>Citrobacter freundii</i>	+
11	T209	<i>Citrobacter freundii</i>	+
12	T212	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+
13	T213	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
14	T214	<i>Enterobacter bugandensis</i>	+
15	T219	<i>Citrobacter freundii</i>	+
16	T222	<i>Citrobacter freundii</i>	+
17	T224	<i>Escherichia coli</i>	+
18	T225	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
19	T226	<i>Escherichia coli</i>	+
20	T227	<i>Escherichia coli</i>	+
21	J229	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
22	J231	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
23	J232	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
24	J233	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
25	J237	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
26	J241	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
27	J244	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
28	J245	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
29	T253	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
30	T228	<i>Escherichia coli</i>	+



### **2.3.1 Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) nakon razgradnje ukupne bakterijske DNA S1 nukleazom**

Ukupna bakterijska DNA podvrgnuta je gel elektroforezi u izmjeničnom polju nakon razgradnje ukupne bakterijske DNA S1-nukleazom (engl. *S1 Pulsed Field Gel Electrophoresis*, S1-PFGE) radi određivanja veličine i broja plazmida u svim izolatima koji proizvode karbapenemaze.

#### ***2.3.1.1 Priprema agaroznih blokova za PFGE elektroforezu***

Kolonije iz prekončnih kultura izolata uzgojenih na MacConkey agaru suspendirane su u fiziološkoj otopini optičke gustoće 4,0 McF. Jedan mL suspenzije zatim je centrifugiran 5 minuta na 7500 x g. U 150 µL pufera za suspenziju bakterijskih stanica (Cell Suspension Buffer) resuspendiran je talog i inkubiran 10 minuta na 55°C. Nadalje, dodano je 20 µL proteinaze K („Proteinase K“, 20 mg/mL, Qiagen) te je slijedila inkubacija u trajanju od 2 minute na 55°C. 170 µL otopljene agaroze niskog tališta (Agarose Low Melting) prethodno zagrijane na 55 °C dodano je u bakterijski lizat te promiješano mikropipetom. Ukupni bakterijski lizat ugrađen je u odgovarajući kalup (Reusable plug mold, Bio-Rad Laboratories, SAD) i time su formirani agarozni blokovi za PFGE elektroforezu. Ovako pripremljena reakcijska smjesa hlađena je 15 minuta na 4°C. Nadalje, agarozni blokovi prebačeni su u Falcon tube volumena 50 mL te je u iste dodano 5 mL pufera za lizu bakterija (Cell Lysis Buffer) i 20 µL proteinaze K te je smjesa inkubirana 1 sat na 54°C uz trešnju od 55 rpm. Nakon završene inkubacije pufer za lizu stanica je uklonjen. S 15 mL sterilne ultra čiste vode 2 puta su isprani agarozni blokovi u trajanju od 15 minuta pri 50°C u vodenoj kupelji uz trešnju od 50 rpm. Pri istim uvjetima inkubacije agarozni blokovi su zatim isprani 3 puta s 15 mL 1 X TE pufera (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) pripremljenim u sterilnoj ultra čistoj vodi. Agarozni blokovi potom su pohranjeni u 5 mL 1 X TE pufera u Falcon tubama volumena 50 mL na 4°C.

### **2.3.1.2 Razgradnja ukupne bakterijske DNA S1 nukleazom**

Ukupna bakterijska DNA u uklopljena u agaroznim blokovima tretirana je S1-nukleazom. S1-nukleaza je enzim koji kida jednolančanu DNA i RNA molekulu te ima sposobnost linearizacije svih superspiraliziranih plazmida. Kidanje DNA molekule se odvija u blago denaturiranim regijama koje nastaju uslijed mehaničkog torzijskog stresa zbog veličine molekule DNA. Također, S1 nukleaza prikazuje ograničenu nukleaznu aktivnost naspram kromosomske DNA. Svaki agarozni blok odrezan kako bi se dobio fragment specifičnih dimenzija za daljnju obradu. Navedeni fragment tretiran je sa 100 µL 1 X reakcijskim puferom za nukleazu S1 („S1 buffer“, Thermo Fisher Scientific, SAD) u trajanju od 30 minuta pri 37°C. Zatim je reakcijski pufer uklonjen, a ukupna bakterijska DNA ukalupnjena u agarozne fragmente tretirana sa S1-nukleazom inkubacijom na 37°C u trajanju od sat vremena u 100 µL restriksijskog pufera (3,5 U S1-nuclease“, 1 X reakcijski pufer za nuklezu S1; Thermo Fisher Scientific, SAD) pripremljenog u sterilnoj ultra čistoj vodi. Razgradnja je zaustavljena uklanjanjem restriksijskog pufera uz dodatak 100 µL 5 XTE pufera (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0) temperature 4°C.

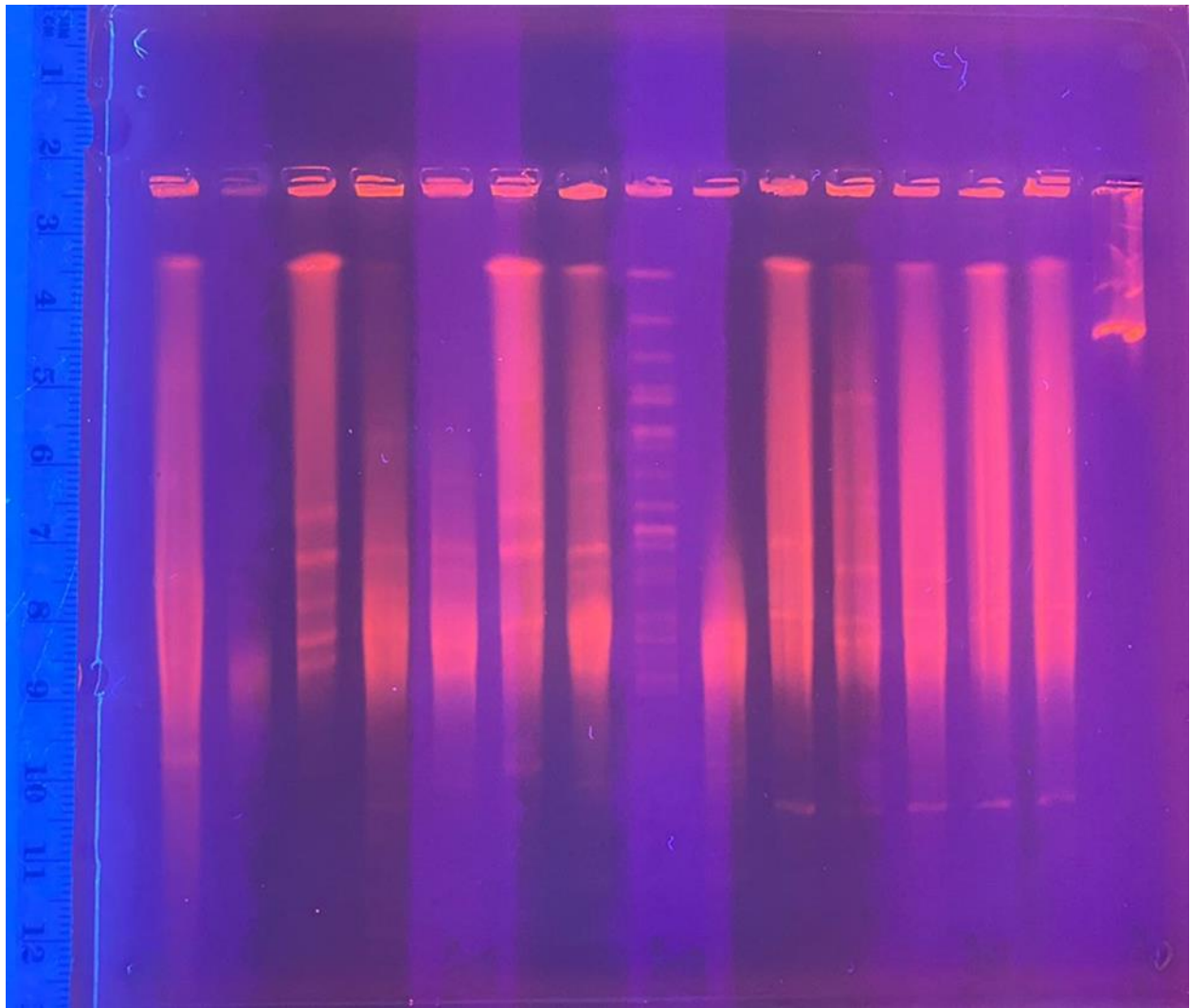
### **2.3.1.3 PFGE elektroforeza**

Agarozni blokovi tj. fragmenti, standard molekulskih masa „CHEF DNA Size Standard“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) i pročišćeni PCR produkt odgovarajućeg gena nanoseni su u jažice. Zatim je dodan 1% gel za elektroforezu u izmjeničnom polju prethodno pripremljen na način da je 1.3 g PDPE agaroze otopljeno u sterilnom 0,5 X TBE puferu (45 mM Tris-baza, 45 mM borna kiselina, 1mM EDTA, pH 8.0) pri temperaturi od 55°C. Elektroforeza je provedena u istom puferu koristeći „CHEF Mapper XA“ (Bio-Rad Laboratories) prema sljedećim parametrima: napon 6 V/cm, kut električnog polja 120°, vrijeme pulsa 6,8 – 38,4 sekundi pri 14°C u trajanju od 19 sati (Slika 5).



**Slika 5.** Uređaj za provođenje PFGE elektroforeze.

Bakterijska DNA je nakon elektroforeze vizualizirana bojanjem gela s 300 mL vodene otopine Sybr® Safe interkalacijske boje ( $\varphi=0,1$  %). Tako obojani gelovi snimljeni su pod UV-svjetlošću koristeći „Genebox“ (Syngene, UK) uređaj (Slika 6).



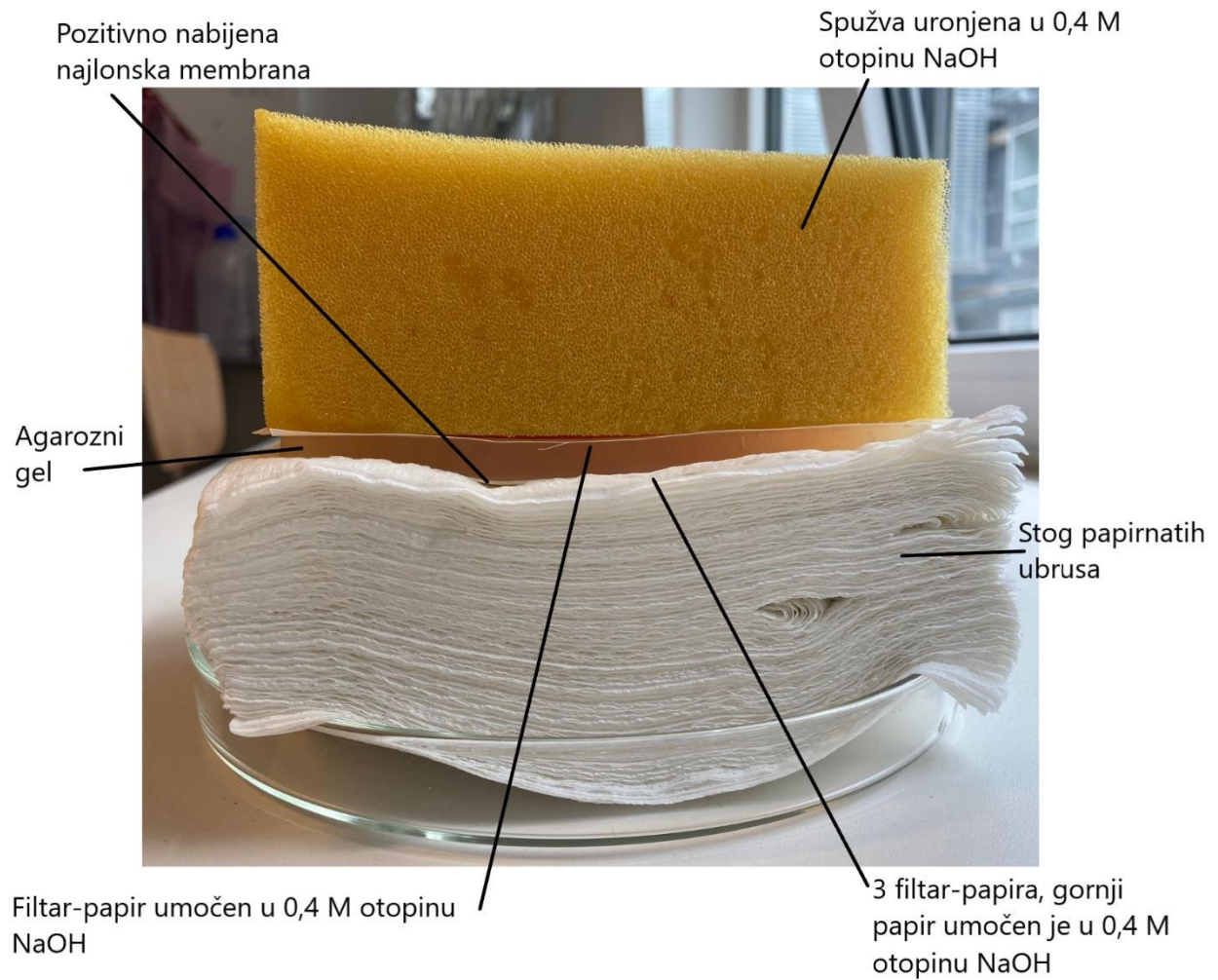
**Slika 6.** Agarozni gel s ukupno 13 različitih izolata; gledajući redom s lijeva na desno izolati u jažicama su slijedeći: *C. freundii*, *E. asburiae*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, marker, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, PCR produkt.

### **2.3.2. Southern hibridizacijska analiza**

Southern hibridizacijska analiza koristi se za prijenos fragmenta DNA s gela na membranu, nakon njihova razdvajanja PFGE elektroforezom.

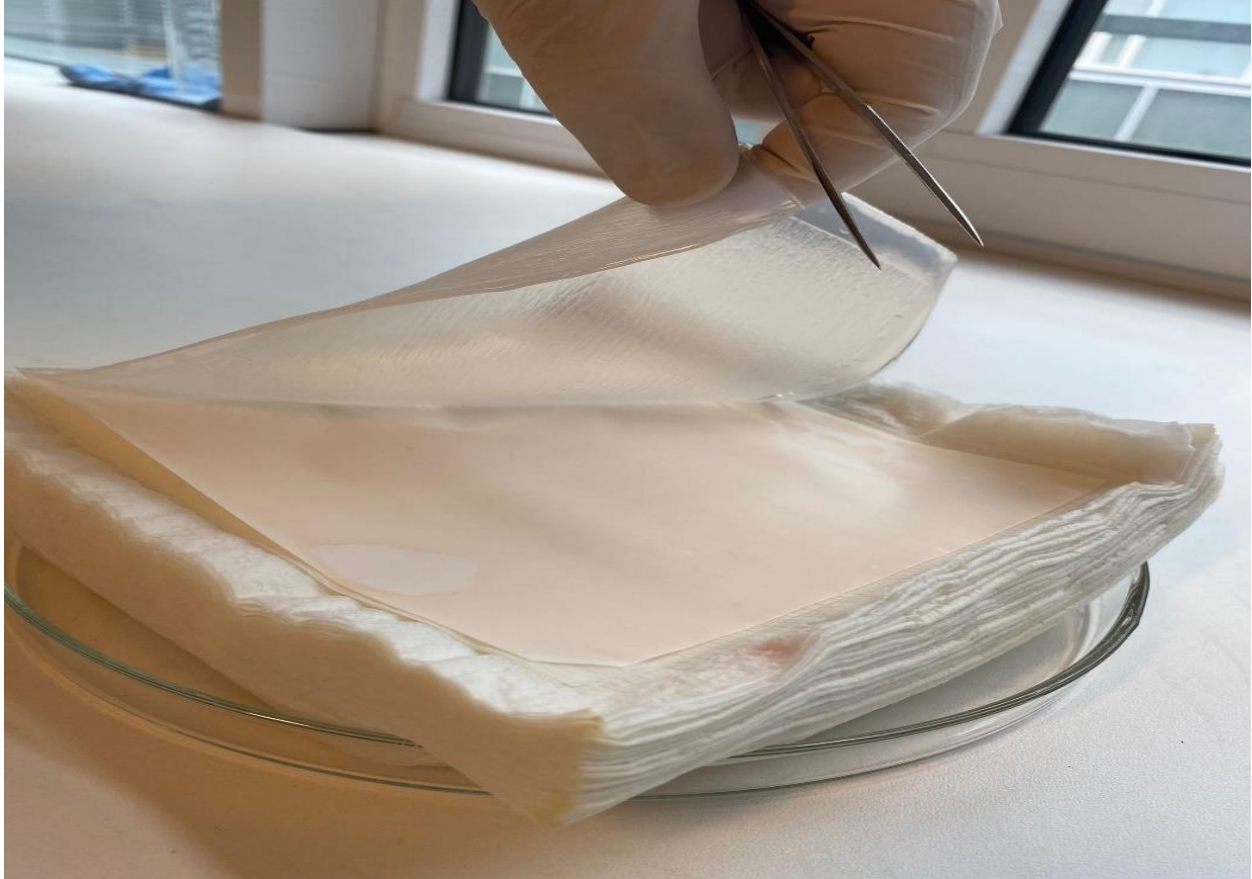
#### ***2.3.2.1 Lužnati prijenos DNA s gela na membranu***

Za vrijeme kapilarnog prijenosa lužnati pufer prolazi kroz gel i denaturira dvolančanu molekulu DNA te na pozitivno nabijenu najlonsku membranu prenosi i veže jednolančane fragmente negativnog naboja. Prvi korak je inkubacija gela u 0,25 M HCL 5 do 10 min. Gel se zatim neutralizira uranjanjem u 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) dva puta po 15 min uz zibanje. Gel je prije slaganja konstrukcije za prijenos potrebno isprati u vodovodnoj vodi. Slojevi papirnatih maramica složeni su na ravnu površinu, zatim se 3 komada filter-papira (dimenzije veće od površine gela) slažu na isti stog papira. Gornji filter-papir uronjen je u 0,4 M NaOH i izravnana staklenom pipetom. Zatim se pozitivno nabijena najlonska membrana (Roche) postavlja na filter-papir koji je prethodno također natopljen s 0,4 M NaOH. Nadalje, gel se postavlja na najlonsku membranu, a rubovi gela oblože trakama parafilma. Gel je potrebno prekriti filter-papirom koji je izrezan u veličini gela i natopiti s 0,4 M NaOH. Naposljetku, na vrh je postavljena spužva (otprilike u dimenzijama gela) natopljena s 0,4 M NaOH i pritisnuta staklenom pločom s utegom te ostavljena preko noći (Slika 7).



**Slika 7.** Hibridizacijska piramida za obrnuti transfer.

Nakon završenog prijenosa pincetom je skinuta membrana s gela (Slika 8), te isprana u 2 x SSC puferu (3 x 5 minuta). Membrana je osušena na zraku na filter-papiru te pohranjena na suhom i čistom mjestu, pri sobnoj temperaturi, do trenutka hibridizacije.



**Slika 8.** Gel nakon prekonoćnog lužnatog prijenosa DNA na najlonsku membranu.

### ***2.3.2.2. Neradioaktivno obilježavanje sonde odsječka gena *bla<sub>KPC</sub>* digoksigeninom metodom nasumične klice***

U tehnikama hibridizacijske analize sonda služi za detekciju specifičnih komplementarnih DNA sljedova s kojima tvori hibridnu molekulu.

Obilježavanje sonde temelji se na sparivanju fragmenata gena *bla<sub>KPC</sub>* s nasumičnim oligonukleotidnim početnicama te sintezi drugog lanca na kalupu jednolančanog odsječka gena Klenowim enzimom koji ugrađuje nukleotide, među kojima su i nukleotidi neradioaktivno obilježeni digoksigeninom (DIG-11-dUTP). Za pripremu sonde upotrijebljen je komplet za obilježavanje iz DIG DNA Labeling and Detection Kit-a (Roche, Cat. No. 11 093 657 910). Fragment gena *bla<sub>KPC</sub>*, pročišćen s gela i otopljen u mikroeproveti u 15 µL sterilne destilirane vode, denaturiran je 10 minuta pri 99 °C u termobloku. Čep mikroeprove omotan je parafilmom i alu-folijom. Nakon toga uzorak je ohlađen u ledu 5 minuta i centrifugiran kako bi se spustio sadržaj. Uzorak je zatim pohranjen na ledu. U denaturirani uzorak navedenim redoslijedom dodano je dva µL smjese nukleotida (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP i 0,35 mM DIG 11-dUTP), Dva µL mješavine heksanukleotida, jedan µL Klenow-og enzima (2 U/ µL). Sadržaj je promiješan uz pomoć vibracijske miješalice pri najmanjoj brzini te kratko centrifugiran. Zatim je reakcijska smjesa inkubirana preko noći pri 37 °C. Dodatkom jednog µL 0,5 M EDTA (pH=8) reakcija je zaustavljena. U svrhu pretaloženja gena u reakcijsku smjesu dodano je 2,5 µL 5M LiCl i 75 µL apsolutnog alkohola. Sadržaj je miješan pomoću vibracijske miješalice, kratko centrifugiran te pohranjen 1 sat pri – 80 °C. Nadalje, uzorak je centrifugiran u mikrocentrifugi pri najvećem broju okretaja na 4 °C i 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, 200 µL hladnog 70% etanola dodano je u talog i provedeno centrifugiranje u trajanju od 5 minuta pri 12 000 okretaja i 4 °C. Talog je zatim osušen na zraku i otopljen u 50 µL sterilne destilirane vode. Sonda se čuva pri – 20 °C.



### 2.3.2.3. Hibridizacija i detekcija hibridizacijskih signala

Prvi korak je prehibridizacija koji započinje stavljanjem membrane u cilindar za hibridizaciju tako da strana membrane na kojoj su uzorci bude okrenuta prema unutrašnjosti tube. Zatim je niz stjenku cilindra dodano 10 mL prethodno zagrijanog hibridizacijskog pufera (10 mL pufera / 100 cm<sup>2</sup> membrana)

**Tablica 3.** Kemijski sastav hibridizacijskog pufera.

Reagensi – radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (mL)
20 x SSC pufer (pH=7)	5 X	25
laurilsarkozil (10 %)	0,1 %	1
natrijev dodecil sulfat, SDS (10%)	0,02 %	0,2
reagens za blokiranje	1 %	1 g
sterilna destilirana voda		73,8
Ukupni volumen:		100

Potom je cilindar stavljen u hibridizacijsku pećnicu s vrtnjom (Slika 9) pri sljedećim uvjetima: temperaturi hibridizacije 68 °C, 1,5 do 2 sata. Drugi korak je hibridizacija, a izvršena je na sljedeći način. DNA sonda denaturirana je 10 minuta pri 99 °C u mikroepreveti osiguranoj od otvaranja (parafilm i alu-folija), u termobloku. Zatim je sonda ohlađena na ledu kroz 5 minuta, i kratko centrifugirana do ponovne uporabe. Pufer korišten u prehibridizaciji je uklonjen, dodano 10 mL svježeg pufera, prethodno zagrijanog na temperaturu hibridizacije. U tako pripremljenu smjesu dodana je *bla*<sub>KPC</sub> sonda (svih 50 µL), cilindar s membranom stavljen je u hibridizacijsku pećnicu s vrtnjom. Reakcijska smjesa puštena je preko noći (12 - 16 h) pri temperaturi 68 °C. Hibridizacijski pufer s DNA sondom prebačen je u staklenu epruvetu i pohranjen pri – 20 °C.



**Slika 9.** Hibridizacijska pečnica s četiri membrane.

#### 2.3.2.4 Ispiranje nespecifično vezane cDNA sonde

U cilindar je dodan pufer za ispiranje membrane A, a ista je isprana 2 puta po 5 minuta pri sobnoj temperaturi.

**Tablica 4.** Kemijski sastav pufera A.

Reagensi – radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (mL)
20 x SSC pufer (pH=7)	2 X	10
natrijev dodecil sulfat, SDS (10%)	0,1 %	1
sterilna destilirana voda	0,02 %	89
Ukupni volumen:		100

Membrana je dodatno isprana u puferu za ispiranje B, 2 puta po 30 minuta pri temperaturi 65 °C.

**Tablica 5.** Kemijski sastav pufera B.

Reagensi – radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (mL)
20 x SSC pufer (pH=7)	0,5 X	2,5
natrijev dodecil sulfat, SDS (10%)	0,1 %	1
sterilna destilirana voda	0,02 %	96,5
Ukupni volumen:		100

Radi detekcije hibridizacijskih signala metodom kolorimetrije membrana je inkubirana 1 minutu u 10 mL pufera 1 (pH = 7,5).

**Tablica 6.** Kemijski sastav pufera 1.

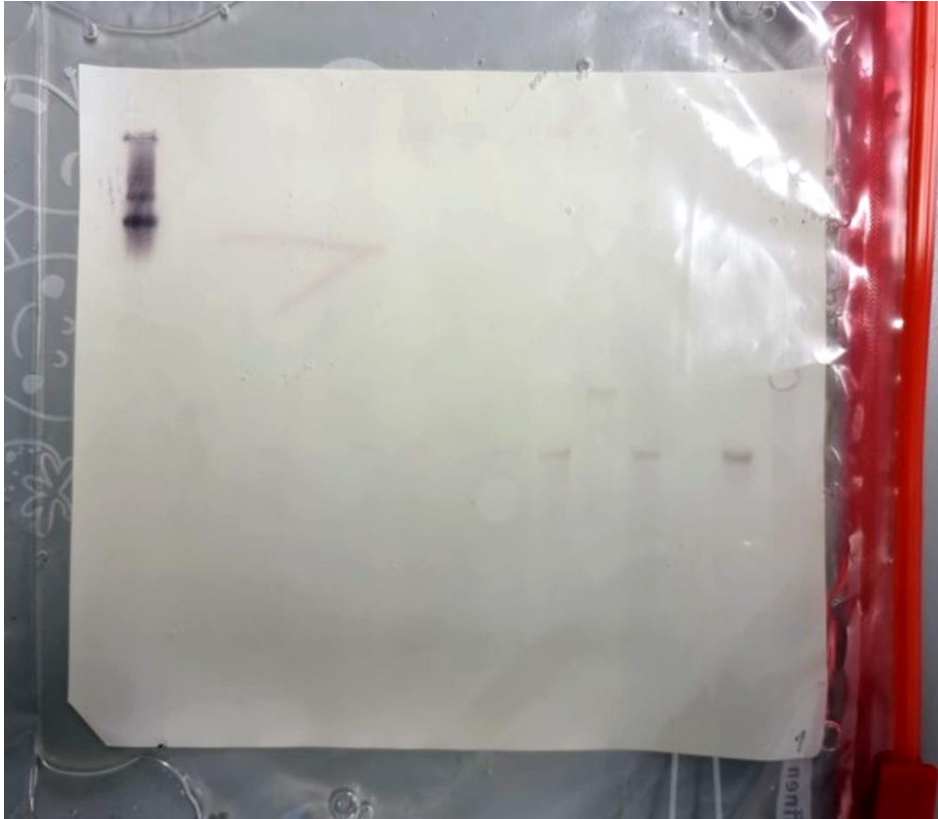
Reagensi – radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (mL)
1M Tris-HCl pufer (pH = 7,4)	0,1 M	50
5M NaCl	0,15 M	15
sterilna destilirana voda		435
Ukupni volumen:		500

Zatim je membrana inkubirana u 80 mL pufera 2 (1g reagensa za blokiranje / 100 mL pufer 1) tijekom 60 minuta, uz okretanje u hibridizacijskoj pećnici prethodno ohlađenoj na sobnu temperaturu. Protu-DIG-AP otopljen je pri 4 °C, centrifugiran 5 minuta pri 10 000 okretaja i otopljen u puferu 2 (4 µL protu-DIG-AP /20 mL pufer 2, razrjeđenje 1 : 5000). Potom je membrana inkubirana 30 minuta uz okretanje u hibridizacijskoj pećnici. Membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u 100 mL pufera 1 i inkubirana tijekom 5 minuta u 20 mL svježe pripremljenog pufera 3 (pH = 9,5).

**Tablica 7.** Kemijski sastav pufera 3.

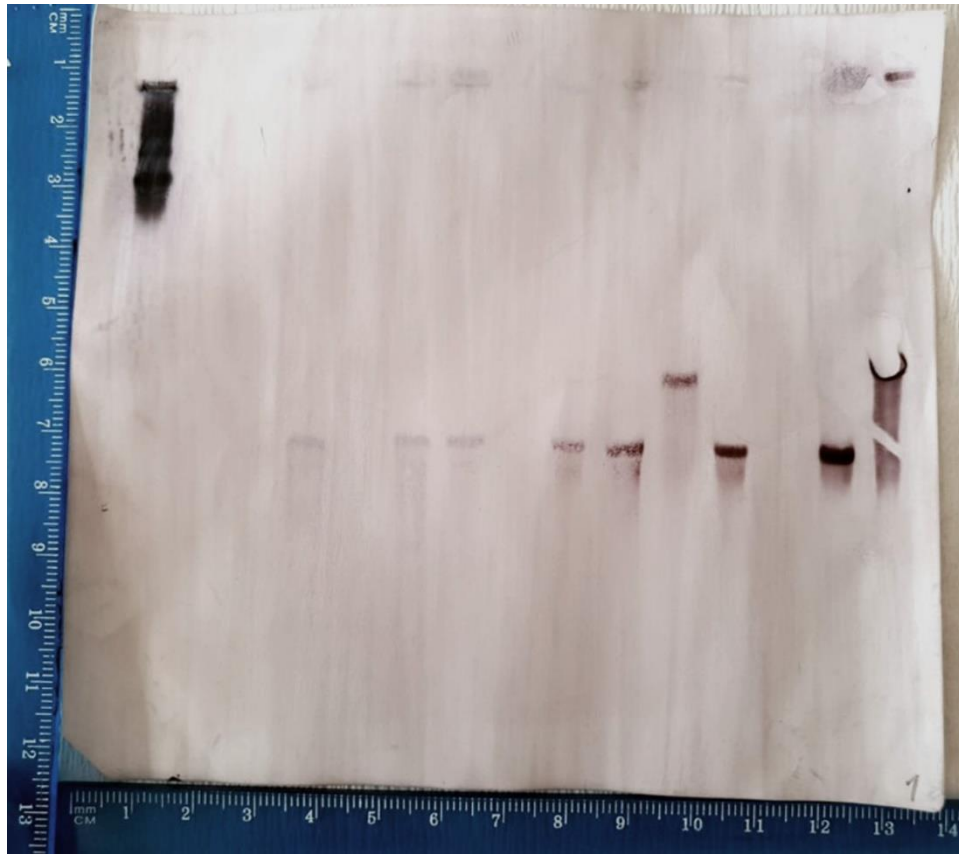
Reagensi – radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (mL)
1M Tris-HCl pufer (pH = 9,5)	0,1 M	10
5M NaCl	0,1 M	2
1M MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,05 M	5
sterilna destilirana voda		83
Ukupni volumen:		100

Zatim je NBT/BCIP supstrat za alkalnu fosfatazu razrijeđen u puferu 3 (200  $\mu$ L NBT/BCIP u 10 mL pufera 3, razrjeđenje 1 : 50), a membrana postavljena u plastičnu vrećicu sa ZIP zatvaračem razvučenu preko staklene Petrijeve zdjelice. Otopina za bojenje je nanescna na membranu i hermetički zatvorena (Slika 10).



**Slika 10.** Razvijanje signala na membrani nakon dodatka NBT/BCIP supstrata za alkalnu fosfatazu.

Naposljetku, membrana je inkubirana na 37 °C dok se nisu razvili signali potrebnog intenziteta nakon čega je membrana isprana u destiliranoj vodi. Membrana je postavljena između 2 lista filterpapira, poklopljena ravnom površinom i sušena preko noći na zraku (Slika 11).



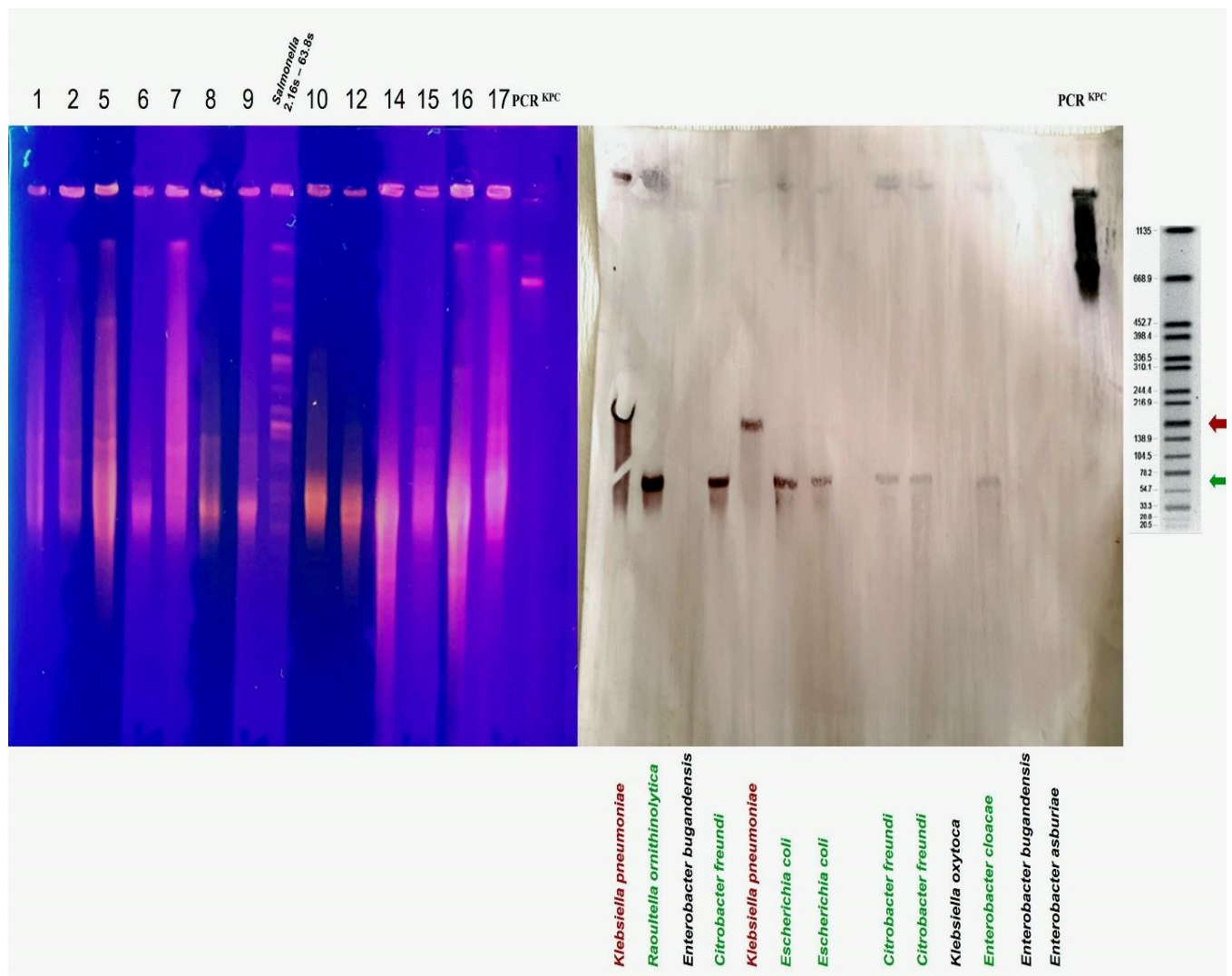
**Slika 11.** Membrana s 13 bakterijskih izolata; tamnije obojenje predstavlja hibridiziranu sondu blaKPC gena na plazmidnoj DNA; gledajući redom s lijeva na desno izolati u jažicama pripadaju slijedećim vrstama: *K. pneumoniae*, *R. ornithinolytica*, *E. bugandensis*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. coli*, marker, *C. freundii*, *C. freundii*, *K. oxytoca*, *E. cloaceae*, *E. bugandensis*, *E. asburiae*, PCR produkt.

## 3. REZULTATI

### 3.1. Identifikacija plazmida koji nose *bla*<sub>KPC</sub> gen

Elektroforezom u pulsirajućem polju (PFGE), u uvjetima opisanim u drugom poglavlju 2.3.1.3., razdvojeni su bakterijski genomi svih 30 izolata. *Salmonella* serotip Braenderup soj H9812 korišten je kao marker za usporedbu i određivanje veličine DNA bakterijskih izolata. Pročišćeni PCR produkt *bla*<sub>KPC</sub> gena tj. pozitivna kontrola nalazi se u zadnjoj jažici s desne strane gela (Slika 6).

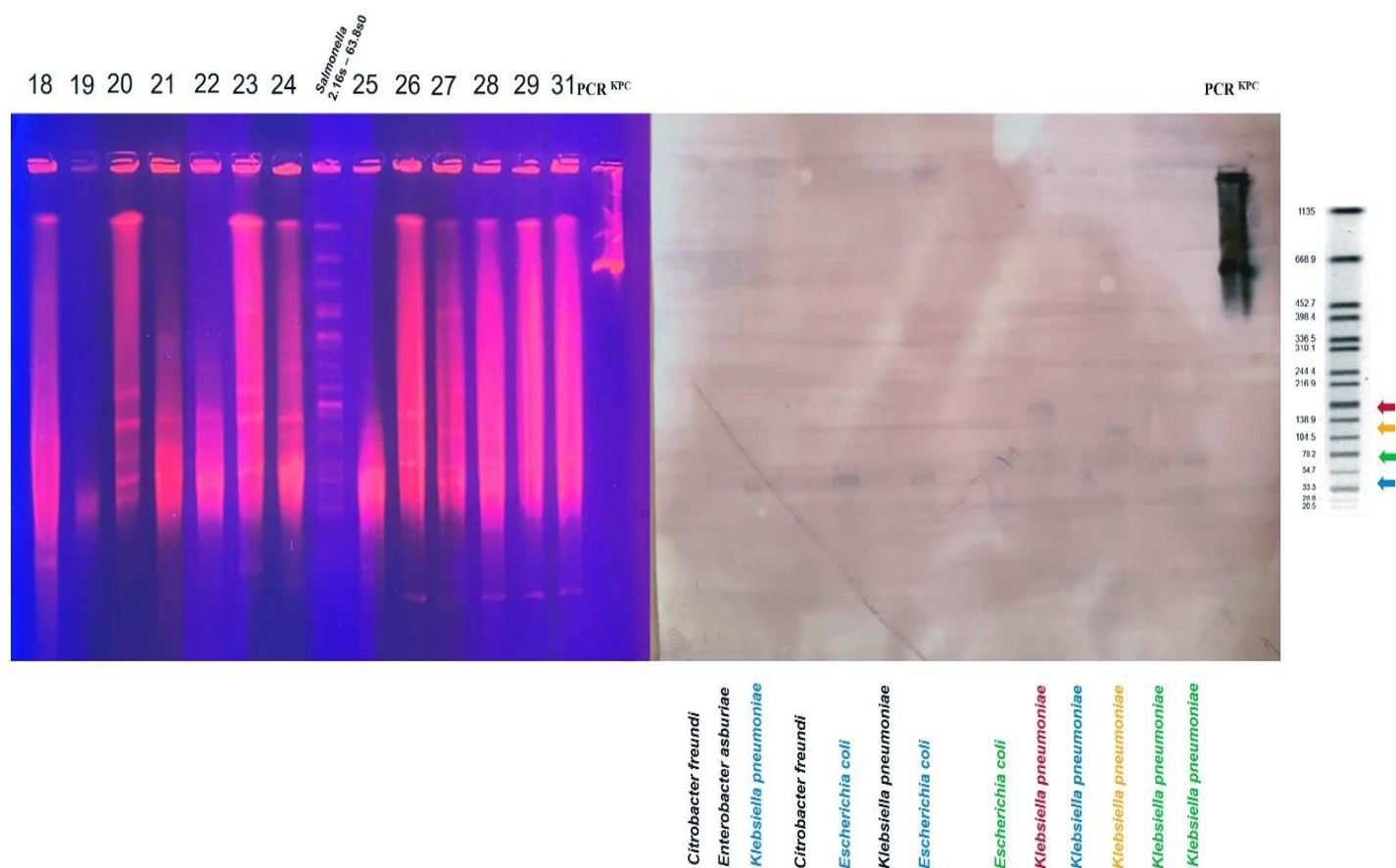
Southern hibridizacijskom metodom identificirana je plazmidna DNA koja kodira *bla*<sub>KPC</sub> gen (Slika 11). Od 30 KPC-pozitivnih izolata u njih 18 utvrđena je plazmidna DNA odgovorna za rezistenciju na karbapeneme različitih veličina (Slike 12 i 13). Pročišćeni PCR produkt *bla*<sub>KPC</sub> gena, odnosno pozitivna kontrola eksperimenta nalazi se na desnom kraju membrane.



**Slika 12.** Usporedni prikaz gela i membrane 1 s utvrđenom veličinom plazmida; Crvenom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 160 kb, zelenom bojom izolati veličine 60.5 kb, a crnom bojom izolati kod kojih nije utvrđen plazmid.



Od ukupno 12 izolata vrste *K. pneumoniae* kod 8 je utvrđeno prisustvo *bla*<sub>KPC</sub> gena na plazmidnoj DNA. Kod izolata iz vrste *K. oxtoca* ovim istraživanjem nije utvrđeno da se gen za rezistenciju na karbapeneme nalazi na plazmidnoj ili genomskoj DNA. Tri izolata vrste *R. ornithinolytica* uključena su u istraživanje međutim samo kod jednog je utvrđen *bla*<sub>KPC</sub> gen na plazmidnoj DNA. Dva izolata vrste *E. bugandensis* nisu pokazala prisustvo ciljanog gena dok je kod jedinog izolata *E. cloacae* uspješno identificiran. Od ukupno 5 izolata *C. freundii*, 3 izolata sadrže plazmidnu DNA s *bla*<sub>KPC</sub> genom. Pet od 6 izolata *E. coli* na plazmidu nosi gen odgovoran za rezistenciju na karbapeneme.



**Slika 13.** Usporedni prikaz gela i membrane 2 s utvrđenom veličinom plazmida; Crnom bojom označeni su izolati kod kojih nije utvrđen plazmid koji nosi *bla*<sub>KPC</sub> gen, plavom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 40 kb, zelenom bojom označeni su izolati s plazmidima veličine 78.2 kb, crvenom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 154 kb, a žutom bojom izolati s plazmidima veličine 114 kb.

Usporedbom položaja fragmenata DNA na agaroznom gelu razdvojenih metodom PFGE elektroforeze i položaja pozitivno razvijenih signala sonde *bla<sub>KPC</sub>* gena na membrani (Slike 12 i 13) utvrđene su veličine plazmida kod ukupno 18 izolata te su rezultati prikazani u Tablici 8.

**Tablica 8.** Veličina plazmida koji kodiraju *bla<sub>KPC</sub>* gen.

BROJ IZOLATA	VRSTA	VELIČINA PLAZMIDA
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	160 kb
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	160 kb
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33.3 kb
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	154 kb
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 kb
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	114 kb
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	78.2 kb
31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	78.2 kb
2	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	60.5 kb
6	<i>Citrobacter freundii</i>	60.5 kb
10	<i>Citrobacter freundii</i>	60.5 kb
12	<i>Citrobacter freundii</i>	60.5 kb
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	60.5 kb
8	<i>Escherichia coli</i>	60.5 kb
9	<i>Escherichia coli</i>	60.5 kb
22	<i>Escherichia coli</i>	33.3 kb
24	<i>Escherichia coli</i>	33.3 kb
25	<i>Escherichia coli</i>	78.2 kb

## 4. RASPRAVA

Česta uporaba karbapenemskih antibiotika u kliničkoj praksi dovela je do pojave rezistentnih sojeva *Enterobacteriaceae*. Današnje globalno širenje karbapenemaza-producirajućih *Enterobacteriaceae* je alarmantno te ima prioritet u pronalasku rješenja zato što karbapenemaze hidroliziraju karbapenemske antibiotike, a geni koji kodiraju karbapenemazu su povezani s visokorizičnim klonovima te se šire horizontalnim prijenosom. Posljedično tome, više su stope mortaliteta i povećani su ekonomski troškovi. Unazad nekoliko godina izolati *K. pneumoniae* koji posjeduju *bla<sub>KPC</sub>* gen postali su jedan od najvažnijih multirezistentnih gram-negativnih patogena kod hospitaliziranih pacijenata<sup>17</sup>.

Hrvatsko povjerenstvo za praćenje rezistencije na antibiotike od 1997. godine vodi aktivan program nadzora nad više od 90% stanovništva. Od 2001. godine CRE izolati označeni su kao visoko zabrinjavajući organizmi te ih je potrebno poslati na ponovno testiranje u Referentni centar za utvrđivanje mehanizma otpornosti. Bedenić i sur. u veljači 2011. godine opisuju pojavu prve bakterijske infekcije uzrokovane *K. pneumoniae* koja proizvodi KPC<sup>18</sup>.

Prirodni okoliš koji je pod antropogenim utjecajem, posebno obalna morska područja, rijeke, jezera i školjkaši, uz bolnički okoliš predstavljaju njihov glavni rezervoar. Također, efluenti iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda jesu značajni putovi za širenje otpornosti na antibiotike putem bolničkih otpadnih voda kroz koje novonastali patogeni ulaze iz bolnice u vodeni okoliš<sup>9</sup>. Trenutno su u Hrvatskoj objavljena samo dva rada s ovom tematikom.

Zbog svega navedenog, cilj ovog istraživanja bio je identificirati plazmide koji kodiraju KPC kod *Enterobacteriaceae* iz okoliša. Od 30 izolata u kojima je sekvencioniranjem utvrđena prisutnost *bla<sub>KPC-2</sub>* gena u njih 18 utvrđen je njihov položaj na plazmidima.

Od veljače 2011. do kolovoza 2013. 547 enterobakterijskih izolata poslano je u Hrvatski referentni centar za praćenje rezistencije na antibiotike. Kod 167 izolata utvrđeno je da proizvode karbapenemaze- 59% VIM, 31% KPC, 8% NDM, 2% OXA-48<sup>19</sup>. Proizvodnja KPC-a otkrivena je samo u *K. pneumoniae*. 48 KPC izolata iz devet centara uključeni su u studiju Jelić i sur. Izolati su prikupljeni iz krvi, urina, trahealnog aspirata kože, mekog tkiva, katetera, cerebrospinalne tekućine te uzoraka pregleda (uzorci stolice i rektalni brisevi)<sup>19</sup>. Ispitivanje antimikrobne

osjetljivosti provedeno je metodom disk difuzije, a minimalne inhibitorne koncentracije za ertapenem, imipenem, meropenem i kolistin otkriveni su E-testom. Rezultati su očitani uz pomoć EUCAST prijelomnih točaka<sup>19</sup>. Fenotipska detekcija proizvodnje karbapenemaza provedena je metodom koja se služi fenilbornom kiselinom za detekciju klase A  $\beta$ -laktamaza. Izolati su tipizirani gel elektroforezom s pulsirajućim poljem XbaI digestirane genomske DNA pomoću sustava CHEF Mapper XA<sup>19</sup>.

Isolate	Date	PFGE profile	Size of bla <sub>KPC</sub> plasmid (kb)	Specimen	Institution	City	MIC (mg/L) <sup>a</sup>				Disk diffusion (mm)	
							ETP	IMP	MEM	CST	GEN	STX
212/E	Nov 11	B	~60	S	H1	Zagreb	>32	>32	>32	0.094	6	6
148/E	May 12	A	~160	TA	H2	Zabok	24	24	24	0.047	18	20
163/E <sup>b</sup>	Jun 12	A	~160	RS	H2	Zabok	3	2	1.5	0.094	19	21
183/E	Jun 12	A	~160	U	H3	Zagreb	8	3	2	0.047	18	22
275/E	Aug 12	A	~160	CSF	H2	Zabok	4	2	2	0.094	17	20
292/E	Sep 12	A	~160	U	H4	Varaždin	>32	4	4	0.094	20	24
324/E <sup>b</sup>	Oct 12	A	~160	U	H2	Zabok	24	8	6	0.064	17	21
325/E <sup>b</sup>	Oct 12	A	~160	TA	H2	Zabok	>32	32	>32	0.047	17	21
326/E	Oct 12	A	~160	TA	H2	Zabok	>32	8	6	0.016	17	21
328/E <sup>b</sup>	Oct 12	A	~160	U	H2	Zabok	2	1.5	1	0.094	19	22
339/E <sup>b</sup>	Oct 12	A	~180	TA	H2	Zabok	>32	>32	>32	0.094	18	19
363/E	Oct 12	A	~210	U	H4	Varaždin	>32	>32	24	0.094	18	23
366/E <sup>b</sup>	Oct 12	A	~160	U	H2	Zabok	>32	8	16	0.125	17	20
379/E	Nov 12	A	~160	RS	H2	Zabok	>32	16	12	0.032	17	20
380/E <sup>b</sup>	Nov 12	A	~180	ST	H2	Zabok	12	24	24	0.094	17	21
477/E	Dec 12	A	~160	U	H2	Zabok	>32	>32	>32	0.094	19	17
15/E	Jan 13	A	~160	B	H5	Zagreb	>32	16	>32	0.047	18	20
74/E	Mar 13	A	~160	U	H5	Zagreb	>32	32	>32	0.094	20	22
243/E	Mar 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	>32	6	16	0.094	20	20
103/E	Apr 13	A	~160	ND	H3	Zagreb	>32	6.0	>32	0.125	18	21
240/E	Apr 13	A	~160	TA	H6	Zagreb	3	0.75	2	0.064	17	20
238/E	May 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	6	6	3	0.047	16	18
239/E	May 13	A	~160	U	H6	Zagreb	6	16	12	0.094	17	20
241/E	May 13	A	~160	TA	H6	Zagreb	12	8	>32	0.064	17	20
242/E	May 13	A1	~160	RS	H6	Zagreb	>32	6	3	0.125	18	20
244/E	May 13	A	~160	B	H6	Zagreb	8	8	6	0.047	19	20
245/E	May 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	8	6	6	0.064	17	19
246/E	May 13	A	~160	B	H6	Zagreb	6	6	12	0.094	18	20
151/E	May 13	A	~160	U	H6	Zagreb	>32	12	12	0.094	19	21
152/E	May 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	>32	8	>32	0.094	18	20
153/E	May 13	A	~160	TA	H6	Zagreb	>32	4	>32	0.125	18	20
154/E	May 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	12	6	6	0.094	17	20
173/E <sup>b</sup>	Jun 13	A	~160	B	H7	Zagreb	6	6	4	0.125	17	19
176/E	Jun 13	A	~160	ND	H6	Zagreb	6	3	6	0.047	20	20
177/E	Jun 13	A	~160	ND	H6	Zagreb	8	6	6	0.064	18	19
178/E	Jun 13	A	~160	ND	H6	Zagreb	4	6	3	0.032	18	20
183/E	Jun 13	A	~160	RS	H8	Čakovec	6	6	6	0.125	18	22
247/E	Jun 13	A	~160	TA	H6	Zagreb	8	8	24	1.5	19	20
248/E	Jun 13	A	~180	U	H6	Zagreb	16	>32	>32	0.016	20	20
201/E	Jul 13	A	~180	U	H9	Zagreb	>32	32	32	0.094	20	20
249/E	Jul 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	6	12	4	0.032	20	21
250/E	Jul 13	A	~180	RS	H6	Zagreb	8	16	32	0.125	18	21
251/E <sup>b</sup>	Jul 13	A	~160	U	H6	Zagreb	24	>32	12	0.032	18	20
252/E	Jul 13	A	~180	RS	H6	Zagreb	12	12	3	0.016	17	21
253/E <sup>b</sup>	Jul 13	A	~160	RS	H6	Zagreb	12	6	6	0.032	20	20
254/E <sup>b</sup>	Jul 13	A	~160	WS	H6	Zagreb	16	16	>32	0.125	18	18
230/E <sup>b</sup>	Aug 13	A	~160	WS	H3	Zagreb	6	8	2	0.064	19	18
255/E	Aug 13	A	~160	C	H1	Zagreb	>32	>32	>32	0.125	18	17

**Slika 14.** Epidemiološki podaci i profili antimikrobne osjetljivosti KPC izolata u Hrvatskoj<sup>19</sup>.

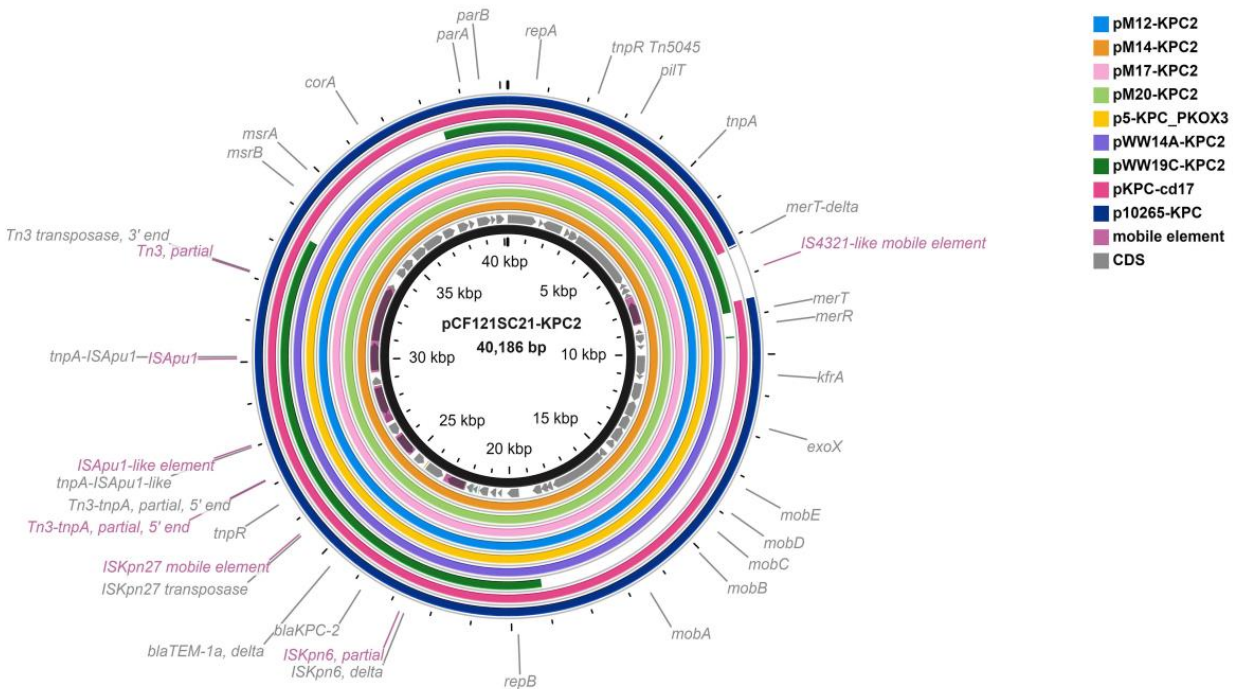
Nekoliko gena odgovornih za rezistenciju na karbapeneme umnoženi su PCR reakcijom i sekvencionirani geni koji kodiraju  $\beta$ -laktamaze klase A. Broj i veličina plazmida u KPC-producirajućim izolatima su određeni pomoću S1-nukleazne PFGE elektroforeze<sup>19</sup> koja je pokazala da svi izolati imaju plazmide veličine od 60 do 210 kb<sup>19</sup>. Southern blot i hibridizacija s *bla*<sub>KPC</sub> specifičnom sondom otkrili su da se *bla*<sub>KPC</sub> u svakom izolatu nalazi na jednom jedinom plazmidu, ali da variraju u veličini<sup>19</sup>. Iako je navedeno istraživanje provedeno na kliničkim izolatima, metode i rezultati ne odskaku u usporedbi s ovim istraživanjem. KPC-pozitivni izolati sakupljeni u ovom istraživanju imaju plazmide veličine od 33,3 kb do 160 kb što je neznatno manja veličina od otkrića Jelić i sur. Jelić i sur. identificirali su u vrsti *E. coli* i *K. pneumoniae* plazmide veličine 160 kb, a ovim je istraživanjem plazmid jednake veličine utvrđen u vrsti *K. pneumoniae*. Također, dva izolata *K. pneumoniae* ovog istraživanja i jedan izolat *K. pneumoniae* iz istraživanja Jelića i sur. jesu veličine 60 kb. Navedeno ukazuje na mogućnost da se radi o istim plazmidima. Ukoliko je zaista riječ o istima, pokazalo bi se bolničko porijeklo rezistentnih plazmida odnosno rezistentnih sojeva koji su u ovom istraživanju sakupljeni u morskom okolišu. Kako bi ovu pretpostavku dokazali potrebna su dodatna molekularna istraživanja kao što je tipizacija plazmida i sekvenciranje. U dosadašnjim prijavljenim istraživanjima plazmidi tipova IncFIB(K), IncN i IncFIIK su najučestaliji nositelji *bla*<sub>KPC</sub> gena, a u navedeno spada i rad Jelića i sur. gdje su svi *bla*<sub>KPC</sub> geni smješteni na plazmidima IncFII grupe.

2019. godine Jelić i suradnici provode istraživanje KPC-producirajućih izolata iz vode rijeke Krapine, uzorkovane 300 metara nizvodno od kanalizacijskog ispusta Opće bolnice Zabok. Pokazalo se da je riječna voda rezervoar bakterija rezistentnih na više lijekova koje potječu iz antropogenih izvora (bolničke i komunalne otpadne vode) te njihovo istraživanje izvještava o prvom slučaju proizvodnje KPC kod *K. pneumoniae* u prirodnom okolišu u Hrvatskoj<sup>17</sup>. Analiza S1-nukleaze-PFGE elektroforeze otkrila je varijabilne profile plazmida među ispitivanim izolatima<sup>17</sup>. Southern analiza s *bla*<sub>KPC</sub>-om i sondom specifičnom za IncFII pokazala je da su *bla*<sub>KPC</sub> geni locirani na IncFII plazmidu 140, 230, 225 i 220 kb<sup>17</sup>, što su veličine plazmida ipak veće od onih dobivenih istraživanjem u sklopu ovog diplomskog rada.

Sposobnost dužeg preživljavanja *K. pneumoniae* koja proizvodi KPC u riječnoj vodi pokazuje razmjere širenja rezistencije na karbapeneme kao i rapidno širenje gena među vrstama čime ističe

potrebu ovog istraživanja. Isto tako, ne manje važan cilj ovog istraživanja je utvrditi sve veću prisutnost KPC-producirajućih sojeva u okolišu.

U lipnju, srpnju i rujnu 2020. u sklopu projekta usmjerenog proučavanju utjecaja pročišćenih podzemskih otpadnih voda u obalnim vodama srednjeg Jadranskog mora u Hrvatskoj Kvesić i suradnici su identificirali 15 izolata *Enterobacteriaceae* (9 *E. coli*, 4 *K. pneumoniae* i 2 *C. freundii*)<sup>9</sup>. Uzorkovana je morska voda u neposrednoj blizini podzemskih kanalizacijskih ispusta Katalinića brig i Stupe-Stobreč koji nakon mehaničkog tretmana ispuštaju otpadne vode šireg područja grada Splita u Splitski i Brački kanal<sup>9</sup>. Svi osim jednog izolata pokazali su otpornost na najmanje jedan karbapenemski antibiotik<sup>9</sup>. Navedeno istraživanje opisuje prvu identifikaciju *E. coli* koja proizvodi KPC u obalnom području morske vode tj. do tada je gen *bla<sub>KPC</sub>* u *E. coli* bio prijavljen samo u zemljama s visokom prevalencijom KPC-producirajuće *K. pneumoniae*. To ukazuje na interspecijski prijenos gena s *K. pneumoniae*. Veličina plazmida u *E. coli* koji nose *bla<sub>KPC</sub>* iznosila je ~40 kb i podudarali su se s IncP6 plazmidima. *C. freundii* iz otpadnih voda u Španjolskoj, *K. oxytoca* u otpadnim vodama Kine te *K. quasipneumoniae* iz Argentine što još jednom je dokaz globalne diseminacije<sup>9</sup>. 2014. godine Galler i suradnici izvješćuju o prvim KPC producirajućim *Enterobacteriaceae* izoliranih izvan medicinske ustanove u Austriji te naglašavaju da je njihova prisutnost u otpadnim vodama niska ali u rastu<sup>20</sup>. PMCRI2-IT plazmid otkriven je 2017. godine u Italiji u kliničkom izolatu ST512 *K. pneumoniae* koji proizvodi KPC-3 te su iste godine Caltagirone i suradnici *in-silico* analizom podataka o NGS transkonjugantu J53R7T *E. coli* otkrili prisutnost gena *mcr* na plazmidu IncX4 veličine 33.303 bp. Isti je pokazivao 99% sličnosti s PMCR12-IT plazmidom<sup>14</sup>. Kao što je prethodno navedeno, ovo istraživanje i istraživanje Jelića i suradnika utvrdilo je također plazmid veličine 40 kb što ukazuje na činjenicu da je isti rasprostranio u prirodan okoliš Republike Hrvatske putem otpadnih voda.

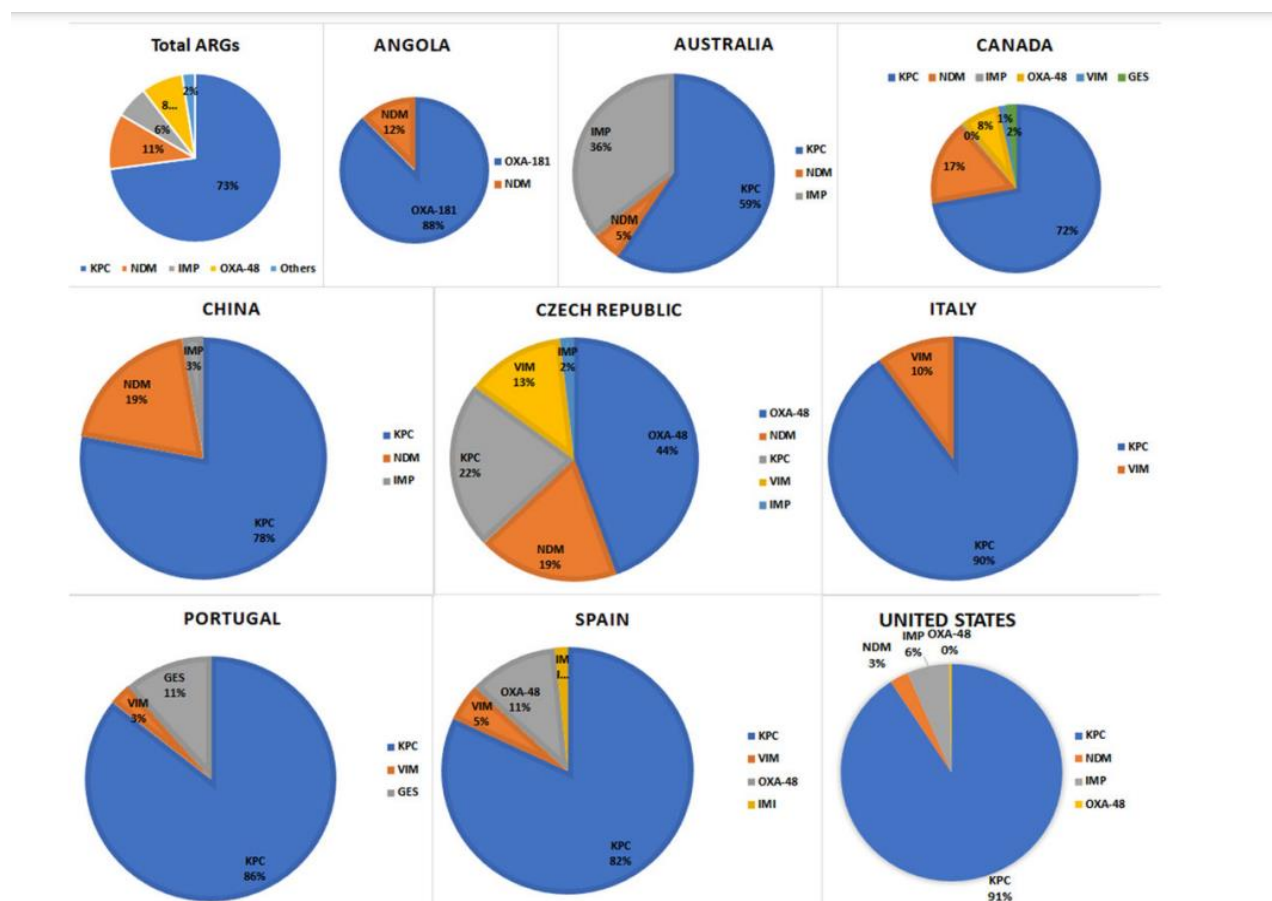


**Slika 15.** Usporedba plazmida pM12-KPC2, pM14-KPC2, pM17-KPC2 i pM20-KPC2 s plazmidima koji nose IncP6 blaKPC-2 okolišnog i kliničkog porijekla opisanih u literaturi: pCF121SC21-KPC2 iz španjolske otpadne vode *Citrobacter freundii*, pKOX3- P5-KPC iz kliničke *Klebsiella oxytoca* u Kini, pWW14A-KPC2 iz otpadne vode *Klebsiella quasipneumoniae* u Argentini, pWW19C-KPC2 iz otpadne vode *Enterobacter asburiae* u Argentini, p10265-KPC iz kliničke *Pseudomonas aeruginosa* u Kini i pKPC-cd17 iz *Aeromonas* sp. iz bolničkog okruženja u SAD-u (koji je 100% identičan plazmidu koji nosi bla<sub>KPC-2</sub> u *Klebsiella oxytoca* iz španjolskih bolnica. Plazmid pCF121SC21-KPC2 uzet je kao referentni plazmid (crni krug)<sup>9</sup>.

Do danas je 27 glavnih skupina plazmida povezano s ARG-ovima u *Enterobacteriaceae*<sup>21</sup>. Široka distribucija plazmidnih skupina replikona zabilježena je u CRE-ovima, uključujući IncF, N, X, A/C, L/M, R, P, H, I i W<sup>21</sup>. Ove skupine replikona povezane su s različitim karbapenemazama među kojima su IncF, A/ C i X najzastupljeniji u proizvodnji karbapenemaza u usporedbi s drugim grupama<sup>21</sup>. Najčešći su IncF plazmidi koji su objavljeni u različitim izvorima diljem svijeta.

U Kanadi je u izolatu ST258 *E. cloacae* identificiran bla<sub>KPC-3</sub> gen na HI2 plazmidu veličine ~120 kb<sup>21</sup> što je ujedno i veličina plazmida identificirana u ovom istraživanju u izolatu *K. pneumoniae*. Također, još jedno istraživanje u Kanadi je identificiralo u vrsti *K. pneumoniae* plazmid FII, I2 veličine 80 kb koji nosi bla<sub>KPC-2</sub> gen<sup>21</sup> što se podudara s veličinom plazmida otkrivenom u ovom

istraživanju, također u vrsti *K. pneumoniae*. Godine 2014 u SAD-u je zabilježen FIB plazmid veličine 30 kb koji nosi *bla*<sub>KPC-2</sub> gen u vrsti *E. cloacae*<sup>21</sup> što se opet podudara s veličinom plazmida otkrivenih ovim istraživanjem. Nadalje, 2019. godine u SAD-u utvrđen je plazmid FII veličine ~116 kb u *E. coli*<sup>21</sup> što je približno veličini plazmida identificiranog ovim istraživanjem u *K. pneumoniae*. Globalna rasprostranjenost utvrđena je i u istraživanju provedenom u Španjolskoj gdje je 2017. godine u bakteriji *K. oxytoca* utvrđen *bla*<sub>KPC-2</sub> gen na plazmidu veličine 60 kb, odnosno veličine 40 kb u *C. freundii*<sup>21</sup>. S obzirom na geografsku udaljenost Španjolske i Hrvatske i na iznimnu sposobnost širenja CRE izolata moguće je da su u našem istraživanju pronađeni isti plazmidi.



**Slika 16.** Učestalost gena karbapenemaze prijavljenih u različitim državama<sup>21</sup>



Ovo istraživanje je tek jedno od svega nekoliko koje dokumentira nalaz i molekularnu karakterizaciju KPC-producirajućih enterobakterija u prirodnom okolišu u Hrvatskoj. Bitno je za istaknuti da KPC-producirajući sojevi nisu do sada izolirani u Hrvatskoj iz morske vode s javne plaže što ukazuje na potencijalni javno-zdravstveni problem u smislu njihovog olakšanog širenja među ljudskom populacijom. Plazmidi koje nose *bla<sub>KPC</sub>* gen, posebice oni od 40 kb, 60 kb i 160 kb, već su prethodno identificirani u bolničkom okruženju te otpadnim vodama u Hrvatskoj što ukazuje na širenje u prirodni okoliš. Ono što dodatno zabrinjava je činjenica da su tijekom terenskog istraživanja istovremeno izolirani KPC-producirajući sojevi iz riječne vode (izolat *K. pneumoniae* J14) te morske vode s javne plaže i sredine Kaštelanskog zaljeva. To sve ukazuje kako bi ova globalno raširena karbapenemaza mogla već sad imati široku rasprostranjenost u vodenom okolišu u Hrvatskoj. Prisutnost ovih vrlo otpornih sojeva u obalnim vodama gusto naseljenih urbanih sredina predstavlja ozbiljnu zabrinutost budući da takav okoliš pruža rezervoar za njihovo uspješno širenje putem horizontalnog prijenosa na druge srodne kao i filogenetski udaljene bakterijske vrste, povećavajući time vjerojatnost učestalosti infekcija karbapenem-rezistentnim sojevima van bolničkog okruženja. S druge strane, identifikacija rezistentnih plazmida kao uspješnih nositelja bitna je sa aspekta istraživanja epidemiologije širenja samog gena jer može pridonijeti boljem razumijevanju porijekla rezistentnih gena kao i pružanju boljih smjernica kod terapijskog liječenja infekcija uzrokovanim CRE sojevima obzirom na njihov genotip rezistencije, povećavajući tako uspješnost empirijske terapije, a istovremeno reducirajući potrošnju samih antibiotika.

## 5. ZAKLJUČAK

S obzirom na vlastito istraživanje, dobivene rezultate te dostupnu literaturu navodim sljedeće preliminarne zaključke:

1. Od 30 KPC-pozitivnih izolata u njih 18 utvrđena je plazmidna DNA odgovorna za rezistenciju na karbapeneme različitih veličina što ukazuje na prodor CRE izolata u prirodni okoliš Republike Hrvatske iz otpadnih voda zdravstvenih ustanova.
2. Od ukupno 18 potvrđenih plazmida odgovornih za rezistenciju na karbapeneme najviše ih pripada (8) vrsti *K. pneumoniae* koja se globalno i smatra rezervoarom istih. Druga najučestalija vrsta (5) u kojoj je utvrđen plazmid s *bla*<sub>KPC-2</sub> genom je *E. coli*. Manji broj izolata pripada (3) *C. freundii*, dok po 1 izolat pripadaju vrsti *R. ornithinolytica* i *E. cloacae*.
3. Najučestaliji plazmid veličine je 60.5 kb i identificiran je u *R. ornithinolytica*, *E. cloacae*, *C. freundii* i *E. coli*. Isto ukazuje na mogućnost da se radi o istim plazmidima unutar različitih bakterijskih vrsta odnosno na olakšano širenje gena horizontalnim prijenosom.
4. Kod izolata *E. coli* plazmidi su nešto manje veličine u odnosu na *K. pneumoniae*, pa se kreću od 33.3 do 78.2 kb.
5. Također, različite veličine plazmida koji nose *bla*<sub>KPC-2</sub> detektiranih u *K. pneumoniae* (160 kb, 154 kb, 114 kb, 78.2 kb, 40 kb, 33.3 kb) jesu pokazatelj kako je ista uistinu rezervoar *bla*<sub>KPC-2</sub> gena te zbog raznovrsnosti plazmida uvelike pridonosi širenju ovog gena i posljedično povećanju mortaliteta i hospitalizacija pacijenata u bolnicama diljem svijeta.

Shodno tome, KPC-producirajuće *Enterbacteriaceae* jesu patogeni čiji je prodor u okoliš i horizontalni prijenos gena prioritetan javno-zdravstveni problem koji zahtjeva više istraživanja i potrebu za pronalaskom učinkovitih antibiotskih tretmana.

## 6. METODIČKI DIO

<b>Ime i prezime učitelja</b>	<b>Predmet</b>	<b>Razred</b>
<b>Emma Bellulovich</b>	Biologija	4. razred gimnazije
<b>Nastavna tema</b> <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikulumu (GIK).</i>		<b>Datum</b>
<b>Genetika bakterija</b>		3.10.2022.

<b>Cilj nastavne teme</b> <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i>	
Stjecanje znanja o genetičkom materijalu bakterija	
<b>Ključni pojmovi</b> <i>Pojmovi koje učenik treba usvojiti uz poučavanje.</i>	<b>Temeljni koncepti</b> <i>Ideje koje učenici trebaju usvojiti na razini razumijevanja i/ ili primjene (uz pomoć konceptualnog okvira poučavanja biologije).</i>
Nukleoid, plazmid, binarna dioba, transformacija, transdukcija, konjugacija, antibiotici, rezistencija na antibiotike	Genom prokariota naziva se nukleoid. Bakterije svoj genom imaju zapisan kao jednu kružnu dvolančanu molekulu DNA. Jedan bakterijski kromosom sadrži sve informacije koje su potrebne za uspješno funkcioniranje bakterijske stanice. Osim bakterijskog kromosoma, bakterije imaju i plazmide. Plazmidi su male kružne dvolančane molekule DNA koji sadržavaju vrlo mali broj gena koji su najčešće odgovorni za stjecanje novih korisnih obilježja poput rezistencije na antibiotike. Bakterije se razmnožavaju nespolno, odnosno binarnom diobom pri kojoj se jedna stanica dijeli na dvije nove koje su identične tj. nazivamo ih klonovi. Bakterije su u današnjem svijetu vrlo raznolikog genoma zbog mutacija i zbog procesa izmjene genoma kao što su transformacija, transdukcija i konjugacija. Transdukcija je mehanizam kojim se strana molekula DNA umetne u bakterijsku stanicu pomoću bakteriofaga. Transformacija je mehanizam kojim bakterijska stanica unosi stranu molekulu DNA iz neposredne blizine u citoplazmu, a konjugacija je prijenos DNA molekule iz jedne bakterijske stanice u drugu. U modernom svijetu, rezistencija na antibiotike je globalni problem i uzrok sve većeg broja hospitalizacija i mortaliteta pacijenata oboljelih od bakterijskih infekcija.
<b>Kontekst poučavanja koncepta</b> <i>Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).</i>	
Na temelju mikroskopskog preparata učenici otkrivaju nastavnu jedinicu, genetiku bakterija. Na temelju slike i modela bakterijske stanice učenici otkrivaju građu bakterija s naglaskom na nasljedni materijal.	

Na temelju slike učenici shvaćaju binarnu diobu bakterija.  
 Uz pomoć slike učenici uče o procesu transdukcije.  
 Na temelju video isječaka učenici shvaćaju procese konjugacije i transformacije.  
 Uz pomoć pretraživanja literature na internetu učenici zaključuju o značaju odgovorne upotrebe antibiotika i dimenzije problema uzrokovanih rezistencijom na antibiotike.

**Odgojno-obrazovni ishodi** *Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*

BIO SŠ. A.4.1	Objašnjava molekularnu osnovu živoga svijeta.
BIO SŠ B.4.2.	Objašnjava životne procese na molekularnoj razini.
BIO SŠ B.4.3.	Analizira utjecaj promjenjivih životnih uvjeta na evoluciju.
BIO SŠ D.4.2	Argumentira i preispituje različita mišljenja o etičkim pitanjima u biološkim istraživanjima i primjeni rezultata bioloških otkrića u svakodnevnome životu suvremenoga čovjeka te donosi odluke o vlastitim postupanjima povezanim s njihovom primjenom

**Primjeri:**

OŠ PRI A.5.1. Učenik objašnjava temeljnu građu prirode

BIO OŠ B.8.4. Povezuje različite načine razmnožavanja organizama s nasljeđivanjem roditeljskih osobina i evolucijom.

BIO SŠ C.3.2. Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.

**Očekivanja međupredmetnih tema** *Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*

uku A.4/5.1.	Upravljanje informacijama Učenik samostalno traži nove informacije iz različitih izvora, transformira ih u novo znanje i uspješno primjenjuje pri rješavanju problema.
uku A.4/5.3.	Kreativno mišljenje Učenik kreativno djeluje u različitim područjima učenja.
uku A.4/5.4.	Kritičko mišljenje Učenik samostalno kritički promišlja i vrednuje ideje.
B.5.2.B	Obrazlaže važnost odgovornoga donošenja životnih odluka.

Br. Ishoda u razradi(RI/IA)	<b>Razrada ishoda</b> <i>Koristiti prema Kurikulumu.</i> <b>Ishodi aktivnosti</b> <i>Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.</i>	<b>Zadatak/ primjer pitanja za provjeru</b> <i>Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.</i>	KR	PU
BIO SŠ. A.4.1	Povezuje građu nukleinskih kiselina s njihovim ulogama	<ul style="list-style-type: none"> <li>- označi dijelove bakterije i iste pokaži na modelu</li> <li>- Što je plazmid i za koja obilježja bakterija je odgovoran?</li> <li>- Što je binarna dioba?</li> <li>- Kako bi izračunali koliko će stanica bakterije nastati od jedne ishodišne stanice?</li> </ul>	R1 R1 R1 R2	+ + + +/-
BIO SŠ B.4.2.	Analizira promjene na razini gena (mutacije), građe i broja kromosoma.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Što je transdukcija?</li> <li>- Što je konjugacija?</li> <li>- Koja je razlika između bakterijske stanice koja sadržava f plazmid u odnosu na onu koja nema taj plazmid?</li> <li>- Što je transformacija?</li> </ul>	R2 R1 R2 R1	+/- + +/- +
BIO SŠ B.4.3.	Opisuje utjecaj civilizacije na životne uvjete te pojavu i širenje bolesti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zašto nije dobro stalno koristiti antibiotike i „na svoju ruku“ uzimati lijekove</li> <li>- Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) koje su bakterije svrstane u listu prioriternih patogena iz 2017. godine?</li> <li>- Koji antibiotici se koriste kao „zadnja linija obrane“ organizma od bakterijskih infekcija?</li> </ul>	R3 R3 R3	+/- +/- +/-
BIO SŠ D.4.2	Prepoznaje značenje vlastite odgovornosti za svoje zdravlje	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zašto je moderno doba ujedno i doba rastuće rezistencije na antibiotike i što možeš učiniti kako bi to spriječio?</li> </ul>	R3	+/-
<p><b>Kognitivna razina (KR):</b> I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema  <b>Procjena uspješnosti učenja (PU):</b> – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika  <b>Br. ishoda u razradi (RI):</b> dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikuluma Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda(npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari građene od sitnih čestica; BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednostaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ C.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije)  <b>(IA):</b> broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1.Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)</p>				

<b>Tijek</b>						
Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata) - Kratki tablični pregled strukture nastavnog sata s iskazanim dominantnim aktivnostima i sociološkim oblicima rada te predviđenim trajanjem za svaki strukturni element sata (po potrebi dodati retke tablice). Uz svaku aktivnost obavezno navesti oznaku ishoda u razradi (prema Kurikulum Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.						
<b>Tip sata</b>		Obrada novog nastavnog sadržaja	<b>Trajanje</b>	45 minuta		
BR. NASTAVNOG SATA	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST	BR. ISHODA I MPPT OČENJIVANJA	KORISTITI	METODA	OBLIK RADA TRAJANJE (min)
	<b>Početni dio</b>	Učenike srdačno pozdravljam i predstavljam im se. Učenike dijelim u grupe po četvero, dijelim im mikroskope te im zadajem da prepoznaju koji organizam promatraju. Ona grupa koja prva odgonetne da je riječ o bakterijama dobiva nagradu. Time najavljujem cilj sata i naslov pišem na ploči „Genetika bakterija“	U	PM, M	PR	G 5
	<b>Središnji dio</b>	Na slajdu broj 1 prikazana je građa bakterija s naglaskom na nasljedni materijal- nukleoid i plazmid. Pitam jednog učenika da označi dijelove bakterije (nukleoid, plazmid, stanična membrana, stanična stijenka, citoplazma, R2), te drugog učenika da iste pokaže na modelu bakterijske stanice. Pitam učenike da opišu nasljedni materijal bakterija (jedna kružna dvolančana molekula DNA, R1) i navodim ih da je isto bakterijski kromosom. Učenike podsjećam da se genom prokariota naziva nukleoid. Opiši izgled plazmida (mala kružna dvolanačana DNA, R1) te promisli za kakva svojstva bakterija bi taj plazmid bio odgovoran (za neka korisna obilježja poput rezistencije na antibiotike, R2).	U/N	PP, MD,	R, I, D	I, F
		Slajd broj 2 prikazuje razmnožavanje bakterija, odnosno binarnu diobu (od jedne stanice nastaju dvije, R1). Jednog učenika zadužujem da opiše sliku binarne diobe, a druge da nadopune odgovor ukoliko nešto nedostaje. Zajednički zaključujemo da se bakterije razmnožavaju nespolno, i da od jedne stanice nastaju dvije potpuno identične stanice, odnosno klonovi. Učenicima ukazujem na to da se bakterije vrlo brzo razmnožavaju te navodim primjer dijeljenja <i>E.coli</i> svakih 20 minuta. Također, učenike navodim da broj bakterija raste eksponencijalno te ih pitam kako bi to zapisali matematičkom formulom ( $2^n$ , R2). Time se na slajdu broj 2 otvara formula za izračun ukupnog broja bakterija. Naglašavam da rast bakterija ovisi o nekoliko čimbenika (nutrijenti, prostor) te da će broj dobiven matematičkim računom biti procjena. Nacrtaj na ploči diobu bakterijske stanice do 7 generacije.	U/N	PP,	R,	I, F
		Slajd broj 3 prikazuje proces transdukcije. Učenike upitam da opišu sliku te zajednički definiramo proces transdukcije	U/N	PP	R,	F, I

	(mehanizam kojim se strana molekula DNA umetne u bakterijsku stanicu pomoću bakteriofaga, R2).					
	Na slajdu broj 4 nalazi se kratki video isječak o procesu konjugacije. Nakon viđenog sadržaja učenike pitam što je proces konjugacije (mehanizam prijenosa iz jedne bakterijske stanice u drugu izravnim kontaktom R1). Kako se označavaju te dvije stanice? ( $F^+$ i $F^-$ , R1) Objasni ih? ( $F^+$ je donorska stanica koja posjeduje F faktor tj. plazmid koji omogućuje stvaranje spolnog nastavka, a $F^-$ stanica recipijent, kad se te dvije stanice povežu donorska stanica može svoj plazmid ubaciti u recipijentsku stanicu, R2). Učenike upoznajem i tražim da razmisle te odgovore koja su s tri moguća scenarija nakon uspješnog prijenosa DNA molekule u drugu bakterijsku stanicu.	U/N	PP, VL	R, F, I		
	Na slajdu broj 5 nalazi se kratki video isječak o procesu transformacije. Nakon što učenici pogledaju video, tražim da objasne transformaciju (transformacija je mehanizam kojim bakterijska stanica unosi stranu molekulu DNA iz neposredne blizine u citoplazmu, a konjugacija je prijenos DNA molekule iz jedne bakterijske stanice u drugu, R1). Navodim da bakterija mora za takav unos imati specifične gene ili mora biti potaknuta vanjskim podražajima u laboratorijskim uvjetima.	U/N	PP, VL	R	I, F	
	Kako se liječe bakterijske infekcije? (antibioticima, R1) te im prikazujem Sumamed i zamolim jednog od učenika da pročita koje se sve infekcije liječe tim antibiotikom. Zašto nije dobro stalno koristiti antibiotike i „na svoju ruku“ uzimati lijekove (organizam neće reagirati na antibiotik, bakterije će postati otporne na iste., R3). Zatim, na slajdu broj 6 se nalaze kratke smjernice za grupni istraživački rad učenika (prikazano u priložima, kliznica 6) o globalnom problemu rezistencije na antibiotike i posljedica istog. Navodim ih da se služe i udžbenikom i internetom. Nakon što pronađu odgovore na pitanja, zajedno raspravljamo o načinima prevencije i odgovornom društvenom ponašanju.	U	PP, MO, UD Ž	I, R, T	G	
<b>Završni dio</b>	U završnom dijelu sata učenicima dijelim radne listove s pitanjima za ponavljanje (Šest je pitanja za ponavljanje). Rješavamo jedno po jedno pitanje te provjeravam usvojenost sadržaja i objašnjavam ukoliko postoje nejasnoće.	U	RL	R	I	5
<small> <b>Nositelji aktivnosti:</b> N – nastavnik, U – učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)  <b>Koristiti u izvedbi:</b> RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, VL – video lekcija, APP – digitalni alat, P/SU – platforma/sustav učenja na daljinu, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL – anketni listić TM – tekstualni materijali (dodati prema potrebi)  <b>Metode:</b> PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje  <b>Oblici rada:</b> I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno         </small>						

**Materijalna priprema** *Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvorna stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.*

Izvorna stvarnost: Mikroskopski preparat *E.coli*, antibiotik, model bakterijske stanice  
Nastavna sredstva: PPT prezentacija, list za ponavljanje, Internet, živa riječ nastavnika, udžbenik  
Nastavna pomagala: LCD projektor, ploča, mobitel

**Plan učeničkog zapisa** *Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.*

### GENETIKA BAKTERIJA

- Jedna kružna molekula DNA
- Plazmid
- Binarna dioba
- Transdukcija
- Transformacija
- Konjugacija
- Rezistencija na antibiotike

**Vrednovanje** *Različiti pristupi vrednovanju.*

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
Kroz pitanja koja postavljam tijekom nastavnog sata nakon svake kliznice provjeravam jesu li učenici sve razumjeli te objašnjavam ono što nisu.	Na samom kraju sata učenike pitam je li im sve jasno te treba li im još što pojasniti.	Učenicima na kraju obrade novog nastavnog sadržaja dijelim radne listove. Prozivajući učenike provjeravam točnost odgovora i jesu li usvojili obrađeni sadržaj.

**Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju** *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema učenika s teškoćama u učenju.

**Prilagodba za darovite učenike** *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema darovitih učenika.

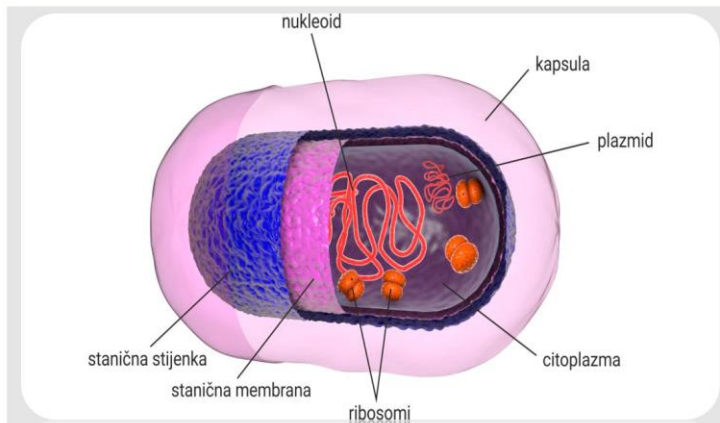


PowerPoint prezentacija, list za ponavljanje.

PowerPoint prezentacija:

Kliznica 1

## NASLJEDNI MATERIJAL BAKTERIJA



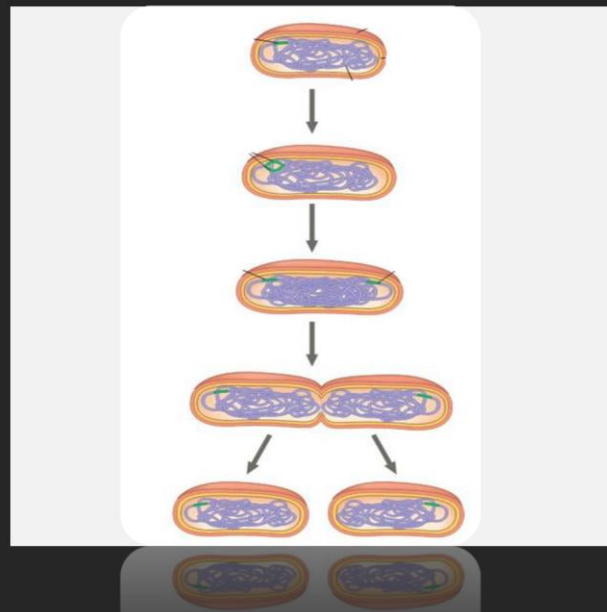
- 1 kružna dvolančana molekula DNA- bakterijski kromosom
- Nukleoid- genom prokariota
- Plazmid- mala kružna molekula DNA odgovorna za nova, korisna obilježja poput rezistencije na antibiotike

Kliznica 2

## RAZMNOŽAVANJE BAKTERIJA

- Binarna dioba
- Klonovi

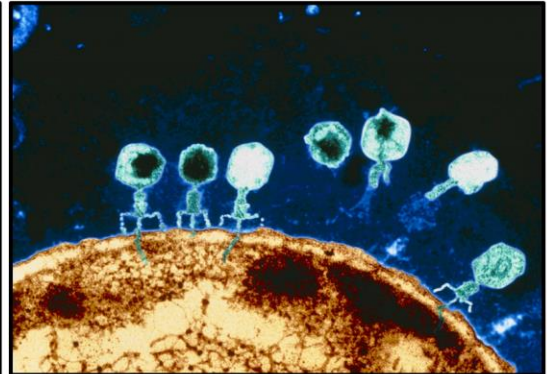
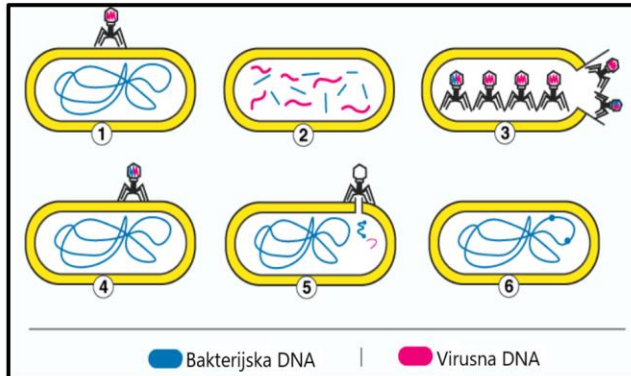
Broj bakterija =  $2^n$   
n-broj diobi



Kliznica 3

# IZMJENA GENOMA BAKTERIJA

## 1. TRANSDUKCIJA

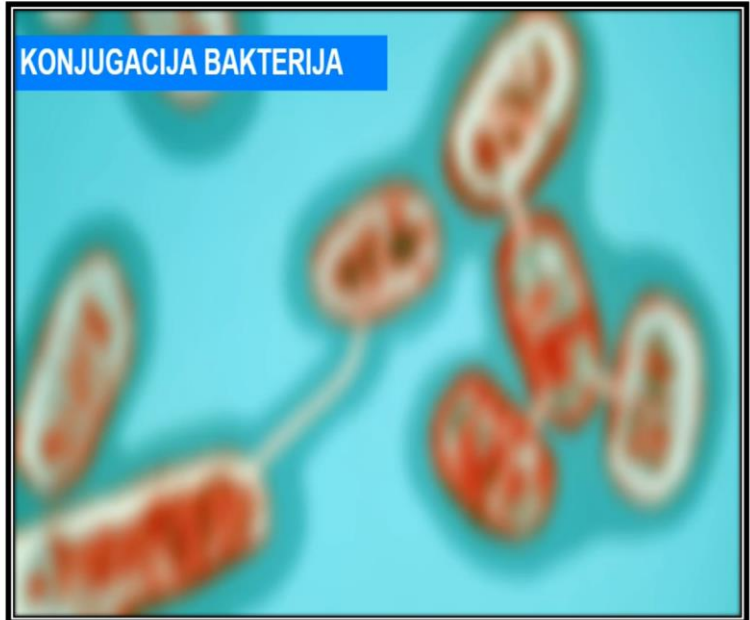


Kliznica 4

# IZMJENA GENOMA BAKTERIJA

## 2. KONJUGACIJA

## KONJUGACIJA BAKTERIJA



Kliznica 5

## IZMJENA GENOMA BAKTERIJA

### 3. TRANSFORMACIJA

## TRANSFORMACIJA BAKTERIJA



Kliznica 6



## ISTRAŽI SAM!

Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) koje su bakterije svrstane u listu prioriternih patogena iz 2017. godine?

Koji antibiotici se koriste kao „zadnja linija obrane” organizma od bakterijskih infekcija?

Zašto je moderno doba ujedno i doba rastuće rezistencije na antibiotike i što možeš učiniti kako bi to spriječio?



## Pitanja za ponavljanje:

Ime i prezime	
Datum	

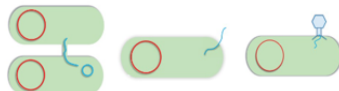


### GENETIKA BAKTERIJA

1. Zaokruži točan odgovor. Što nije neophodno za život bakterijske stanice?

- a) Bakterijski kromosom
- b) Ribosom
- c) Plazmid
- d) Stanična stijenka

2. Imenuj svaki prikazani mehanizam izmjene genoma bakterija.



3. Kultura bacila sijena (*Bacillus subtilis*) uzgaja se na hranjivoj podlozi. Poznato je da se brojnost bacila sijena učetverostruči svakih 4 sata u laboratorijskim uvjetima.

a) Izračunaj koliko traje binarna dioba bacila sijena u laboratorijskim uvjetima.

b) Izračunaj koliko je vremena potrebno da od 1 ishodišne bakterijske stanice nastane više od 1000 bakterijskih stanica.

4. Objasni mehanizam konjugacije.

5. Nukleinska kiselina nekih bakteriofaga ugrađuje se u bakterijski kromosom ili plazmid. Takav integrirani virusni genom može se izrezati iz bakterijske molekule DNA u specifičnim uvjetima okoliša i započeti svoje umnažanje, čime će uništiti bakterijsku stanicu. Samo izrezivanje virusne DNA molekule regulirano je proteinom represorom koji kad se veže za bakterijsku molekulu DNA sprječava njezino izrezivanje i umnažavanje. Ako je bakterija izložena štetom djelovanju okoliša poput UV zračenja ili nekih toksina ona počinje proizvoditi specifične spojeve koji joj mogu pomoći u popravku štete na staničnoj razini. Neki spojevi nastali na ovaj način mogu se vezati i na spomenuti protein represor čime započinje umnažavanje bakteriofaga.

a) Koju molekulu blokira protein represor koji je vezan za molekulu DNA?

b) Koje su prednosti za bakteriofag ako protein represor inhibiraju spomenuti spojevi?

6. Razmisli i predloži načine na koje se pojedini mehanizmi izmjene bakterijskog genoma mogu koristiti u genetičkom inženjerstvu.

### Literatura Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.

Čačev T., Grozdanić G., Horvatin K., Krstanac Ž., 2021., Biologija 4, Udžbenik iz biologije za četvrti razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.

Grozdanić G., Horvatin K., Krstanac Ž., 2021., Biologija 4, Radna bilježnica iz biologije za četvrti razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.

### Refleksija nakon poučavanja Zabilješke nakon izvedbe nastavnog sata o uspješnosti sa sugestijama za poboljšanje.

Ova tema je učenicima izrazito zanimljiva jer je vezana za svakodnevni život te je poučavanje prožeto učeničkim iskustvima.

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Shematski prikaz antigenske strukture bakterija iz porodice Enterobacteriaceae <sup>1</sup> . .....	2
<b>Slika 2.</b> Kemijska struktura imipenema, doripenema, meropenema i ertapenema <sup>3</sup> . .....	7
<b>Slika 3.</b> Mehanizam rezistencije na karbapeneme <sup>12</sup> . .....	13
<b>Slika 4.</b> Metodom disk-difuzije određen antibiogram vrste <i>K. pneumoniae</i> (foto: Nora Ballarin). .....	19
<b>Slika 5.</b> Uređaj za provođenje PFGE elektroforeze.....	24
<b>Slika 6.</b> Agarozni gel s ukupno 13 različitih izolata; gledajući redom s lijeva na desno izolati u jažicama su slijedeći: <i>C. freundii</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , marker, <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , PCR produkt. ....	25
<b>Slika 7.</b> Hibridizacijska piramida za obrnuti transfer. ....	27
<b>Slika 8.</b> Gel nakon prekonoćnog lužnatog prijenosa DNA na najlonsku membranu. ....	28
<b>Slika 9.</b> Hibridizacijska pećnica s četiri membrane.....	31
<b>Slika 10.</b> Razvijanje signala na membrani nakon dodatka NBT/BCIP supstrata za alkalnu fosfatazu. ....	34
<b>Slika 11.</b> Membrana s 13 bakterijskih izolata; tamnije obojenje predstavlja hibridiziranu sondu blaKPC gena na plazmidnoj DNA; gledajući redom s lijeva na desno izolati u jažicama pripadaju slijedećim vrstama: <i>K. pneumoniae</i> , <i>R. ornithinolytica</i> , <i>E. bugandensis</i> , <i>C. freundii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> , marker, <i>C. freundii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. cloaceae</i> , <i>E. bugandensis</i> , <i>E. asburiae</i> , PCR produkt. ....	35
<b>Slika 12.</b> Usporedni prikaz gela i membrane 1 s utvrđenom veličinom plazmida; Crvenom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 160 kb, zelenom bojom izolati veličine 60.5 kb, a crnom bojom izolati kod kojih nije utvrđen plazmid. ....	37
<b>Slika 13.</b> Usporedni prikaz gela i membrane 2 s utvrđenom veličinom plazmida; Crnom bojom označeni su izolati kod kojih nije utvrđen plazmid koji nosi blaKPC gen, plavom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 40 kb, zelenom bojom označeni su izolati s plazmidima veličine 78.2 kb, crvenom bojom označeni su izolati čiji su plazmidi veličine 154 kb, a žutom bojom izolati s plazmidima veličine 114 kb. ....	38
<b>Slika 14.</b> Epidemiološki podaci i profili antimikrobne osjetljivosti KPC izolata u Hrvatskoj <sup>19</sup> . ..	41

**Slika 15.** Usporedba plazmida pM12-KPC2, pM14-KPC2, pM17-KPC2 i pM20-KPC2 s plazmidima koji nose IncP6 blaKPC-2 okolišnog i kliničkog porijekla opisanih u literaturi: pCF121SC21-KPC2 iz španjolske otpadne vode *Citrobacter freundii*, pKOX3- P5-KPC iz kliničke *Klebsiella oxytoca* u Kini, pWW14A-KPC2 iz otpadne vode *Klebsiella quasipneumoniae* u Argentini, pWW19C-KPC2 iz otpadne vode *Enterobacter asburiae* u Argentini, p10265-KPC iz kliničke *Pseudomonas aeruginosa* u Kini i pKPC-cd17 iz *Aeromonas* sp. iz bolničkog okruženja u SAD-u (koji je 100% identičan plazmidu koji nosi bla<sub>KPC-2</sub> u *Klebsiella oxytoca* iz španjolskih bolnica. Plazmid pCF121SC21-KPC2 uzet je kao referentni plazmid (crni krug)<sup>9</sup>. ..... 44

**Slika 16.** Učestalost gena karbapenemaze prijavljenih u različitim državama<sup>21</sup> ..... 45

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> WHO globalna lista prioritetnih patogena, 2017.godina. (preuzeto s <a href="https://www.who.int/">https://www.who.int/</a> ) .....	11
<b>Tablica 2.</b> Lista ukupnih izolata kod kojih je identificiran blaKPC gen.....	21
<b>Tablica 3.</b> Kemijski sastav hibridizacijskog pufera. ....	30
<b>Tablica 4.</b> Kemijski sastav pufera A. ....	32
<b>Tablica 5.</b> Kemijski sastav pufera B. ....	32
<b>Tablica 6.</b> Kemijski sastav pufera 1. ....	32
<b>Tablica 7.</b> Kemijski sastav pufera 3. ....	33
<b>Tablica 8.</b> Veličina plazmida koji kodiraju bla <sub>KPC</sub> gen. ....	39

## POPIS LITERATURE

### KNJIGE:

1. Kalenić S. i suradnici, Medicinska mikrobiologija, Medicinska zaklada- Zagreb, 13 izdanje, 2013.
2. Bennett J., Dolin R., Blaser M., Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of infectious diseases, SMTE Books, Philadelphia, 8 izdanje, 2015.

### ZNASTVENI ČASOPISI I ČLANCI:

3. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-4960. doi:10.1128/AAC.00296-11
4. Hilas O, Ezzo DC, Jodlowski TZ. Doripenem (Doribax), a new carbapenem antibacterial agent. *P T.* 2008;33(3):134-137.
5. Matlock A, Garcia JA, Moussavi K, Long B, Liang SYT. Advances in novel antibiotics to treat multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Intern Emerg Med.* 2021;16(8):2231-2241. doi:10.1007/s11739-021-02749-1
6. Bubonja-Šonje M, Abram M. Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Med Flum.* 2014;50(2):128-149.
7. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521-S528. doi:10.1093/cid/ciz824
8. Storhaug KØ, Skutlaberg DH, Hansen BA, Reikvam H, Wendelbo Ø. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae—implications for treating acute leukemias, a subgroup of hematological malignancies. *Antibiotics.* 2021;10(3). doi:10.3390/antibiotics10030322
9. Novak A, Maravic A. Submarine Outfalls of Treated Wastewater Effluents are Sources of Extensively- and Multidrug-Resistant KPC- and OXA-48-Producing Enterobacteriaceae in Coastal Marine Environment. 2022;13(May). doi:10.3389/fmicb.2022.858821
10. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN). doi:10.3389/fmicb.2019.00080
11. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655
12. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging Transcriptional and Genomic Mechanisms Mediating Carbapenem and Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae : a Systematic Review of Current Reports . *mSystems.* 2020;5(6).



doi:10.1128/msystems.00783-20

13. Bush K, Bradford PA. Clinical Microbiology Reviews Volume 33 issue 2 2020 [doi 10.1128\_CMR.00047-19] Bush, Karen; Bradford, Patricia A. -- Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens.pdf. 2020;33(2):1-37.
14. Caltagirone M, Nucleo E, Spalla M, et al. Occurrence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-producing enterobacteriaceae from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV):1-12. doi:10.3389/fmicb.2017.02232
15. Ballarin N. Fenotipska osjetljivost na antibiotike gram-negativnih bakterija u srednjem Jadranu Fenotipska osjetljivost na antibiotike gram-negativnih bakterija u srednjem Jadranu. Published online 2021.
16. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
17. Jelić M, Hrenović J, Dekić S, Goić-Barišić I, Tambić Andrašević A. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water. *J Hosp Infect.* 2019;103(2):147-150. doi:10.1016/j.jhin.2019.04.001
18. Bedenić B, Zujčić-Atalić V, Jajić I, et al. Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase in Croatian University Hospital. *J Chemother.* 2015;27(4):241-245. doi:10.1179/1973947814Y.0000000191
19. Jelic M, Butic I, Plecko V, et al. KPC-producing *klebsiella pneumoniae* isolates in Croatia: A nationwide survey. *Microb Drug Resist.* 2016;22(8):662-667. doi:10.1089/mdr.2015.0150
20. Galler H, Feierl G, Peternel C, et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2). doi:10.1111/1469-0691.12336
21. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1457(1):61-91. doi:10.1111/nyas.14223

#### **LITERATURA S INTERNETA:**

1. <https://www.who.int/>

#### **METODIČKA LITERATURA:**

1. Čačev T., Grozdanić G., Horvatin K., Krstanac Ž., Biologija 4, Udžbenik iz biologije za četvrti razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb, 2021.
2. Grozdanić G., Horvatin K., Krstanac Ž., Biologija 4, Radna bilježnica iz biologije za četvrti razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb, 2021.

## SKRAĆENICE:

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoksiribonukleinska kiselina
LPS	<i>Lipopolysaharide</i>	Lipopolisaharid
PBP proteini	<i>Penicillin-binding proteins</i>	Penicilin vezujući proteini
ESBL	<i>Extended spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>	$\beta$ -laktamaze proširenog spektra
MDR	<i>Multidrug resistant</i>	Višestruka otpornost na lijekove
CRE	<i>Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> otporne na karbapeneme
WHO	<i>World Health Organization</i>	Svjetska zdravstvena organizacija
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Lančana reakcija polimerazom
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>	Gel elektroforeza u pulsirajućem polju
RE	<i>Restriction endonuclease</i>	Restriksijska endonukleaza
pb	<i>Base pair</i>	Parovi baza
kb	<i>Kilobase</i>	Kilobaza