

# Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enetrobakterija otpornih na karbapeneme

---

Jelić, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:737644>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARKO JELIĆ

**MEHANIZMI REZISTENCIJE NA  
ANTIBIOTIKE U ENTEROBAKTERIJA  
OTPORNIH NA KARBAPENEME**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARKO JELIĆ

**MEHANIZMI REZISTENCIJE NA  
ANTIBIOTIKE U ENTEROBAKTERIJA  
OTPORNIH NA KARBAPENEME**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Arjana Tambić Andrašević

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MARKO JELIĆ

**MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL  
RESISTANCE IN CARBAPENEM-  
RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Arjana Tambić Andrašević, Ph.D., Professor

Zagreb, 2018

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmaceutske znanosti.

Rad je izrađen na Odjelu za bakteriologiju i bolničke infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, u okviru doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem mentorici prof. Arjani Tambić Andrašević na ukazanom povjerenju, pruženoj prilici za daljnjim znanstvenim razvojem, prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem kolegicama i kolegama sa Zavoda za kliničku mikrobiologiju i ostalim djelatnicima Centralnog dijagnostičkog laboratorija Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ na pomoći, toleranciji i pozitivnoj radnoj atmosferi.*

*Posebna zahvala dr.sc Dušici Vujakliji i Anti Tadinu bez čije bezrezervne tehničke podrške izrada ovog rada ne bi bila moguća.*

*Veliko hvala mojoj dragoj obitelji na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i vjeri u uspjeh.*

*Hvala Stefanu na prijateljstvu, potpori i besmrtnom optimizmu.*

*I za kraj, hvala ti Sarah jer si bila oslonac i podrška i zato što si svemu ovome dala smisao.*

*„Sitting quietly, doing nothing, Spring comes, and the grass grows, by itself.“*

*- Matsuo Basho*

*Ovaj rad posvećujem mom didu Grgi.*

## SAŽETAK

S obzirom da se karbapenemi koriste kao lijekovi posljednje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim enterobakterijama otpornim na cefalosporine proširenog spektra, rastuća prevalencija enterobakterija otpornih na karbapeneme zabrinjavajući je problem koji je poprimio globalne razmjere. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem da se utvrde mehanizmi rezistencije na karbapeneme, njihova zastupljenost, pozadina višestruke rezistencije i da se okarakteriziraju epidemiološke poveznice među enterobakterijama koje pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme na području Republike Hrvatske. U ovo istraživanje uključeni su svi klinički izolati enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme prikupljeni tijekom 2011. i 2012. godine na području Republike Hrvatske kroz redovito djelovanje Nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike i Referentnog centra za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva RH. Ukupno je prikupljeno 250 izolata enterobakterija iz 22 klinička mikrobiološka laboratorija pri čemu su većinu činili izolati *K. pneumoniae* (60,4 %) i *E. cloacae* (33,2 %). Analizirani izolati bili su višestruko rezistentni s varijabilnom stopom rezistencije na karbapeneme. Uz proizvodnju beta-laktamaza, detektirana je i prisutnost gena za rezistenciju na aminoglikozide, sulfonamide, tetracikline, kinolone i kloramfenikol. 65,6% izolata nije proizvodilo karbapenemaze iako je u analiziranoj zbirci detektirana proizvodnja karbapenemaza KPC-2, VIM-1, NDM-1 i OXA-48. Smanjena osjetljivost na ertapenem, temeljena na smanjenoj propusnosti bakterijske stanice, bila je povezana sa sniženom ekspresijom gena koji kodiraju porinske kanale ompK35, odnosno ompC u vrste *K. pneumoniae*, odnosno *E. cloacae*. Među izolatima *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze zabilježena je značajno viša stopa proizvodnje beta-laktamaze CTX-M-15. Molekularnom genotipizacijom utvrđeno je poliklonsko širenje karbapenemaza, uz iznimku karbapenemaze KPC-2 čije je širenje povezano s klonom ST258 *K. pneumoniae*. Širenje karbapenemaze VIM-1 među *E. cloacae* povezano je s klonskim tipovima ST92, ST200 i ST105. Klonski tipovi ST15 i ST16 *K. pneumoniae* glavni su pokretač širenja karbapenemaza VIM-1, NDM-1 i OXA-48. Širenje enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze bilo je poliklonsko, no genetička varijabilnost je ovisila o promatranoj bakterijskoj vrsti. Izolati *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze pokazivali su povećanu genetičku raznolikost, dok je smanjena raznolikost izolata *K. pneumoniae* bila posljedica širenja klonskog tipa ST437. Geni koji kodiraju karbapenemaze smješteni su na plazmidima pri čemu je gen *bla*<sub>KPC-2</sub> identificiran na plazmidima FIIIs, *bla*<sub>NDM-1</sub> na IncA/C, IncL/M i IncR, *bla*<sub>VIM-1</sub> na IncN i IncL/M i *bla*<sub>OXA-48</sub> na

epidemijskom IncL/M plazmidu veličine ~60 kb. Pojava i širenje enterobakterija otpornih na karbapeneme je problem koji nije zaobišao niti Republiku Hrvatsku. Mehanizmi rezistencije na antibiotike enterobakterija otpornih na karbapeneme analiziranih u ovom radu i njihov epidemiološki kontekst u skladu su s općom slikom rezistencije enterobakterija na karbapeneme koja se opisuje u znanstvenoj literaturi.

**Ključne riječi:** *Enterobacteriaceae*, otpornost na karbapeneme, karbapenemaze, molekularna epidemiologija, plazmidi, KPC-2, VIM-1, NDM-1, OXA-48



## **EXTENDED ABSTRACT**

**Introduction:** Carbapenems, the only widely marketed beta-lactams stable to ESBLs and AmpC enzymes, are the most potent class of beta-lactams recognized as antibiotics of last resort in treatment of infections caused by multiple resistant Enterobacteriaceae. Increased use of carbapenems has led to emergence and spread of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) which is now recognized as a worldwide healthcare challenge. Low success rates of CRE infection treatment usually result in increased mortality, comorbidities, length of hospital stay and healthcare costs. The aim of this study was to identify and assess the prevalence of resistance mechanisms underlying carbapenem resistance, to investigate multidrug resistance and to elucidate genetic relatedness among carbapenem non-susceptible enterobacterial isolates collected during 2011 and 2012 in Croatia.

**Materials and methods:** This study was performed on all carbapenem non-susceptible enterobacterial isolates collected during 2011 and 2012 in Croatia through regular activities of Resistance Surveillance Program and Croatian Reference Centre for Antibiotic Resistance Surveillance. Antimicrobial susceptibility profiles and production of carbapenemases were assessed phenotypically. Detection of resistance genes was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA sequencing was used for additional characterization of beta-lactamase genes. Expression of porin and efflux-pump encoding genes in *K. pneumoniae* (*ompK35/36*, *acrB*), *E. cloacae* (*ompC/D*, *acrB*) and *E. aerogenes* (*omp35/36*, *acrA*) was measured by Quantitative Real-Time PCR (qPCR). Molecular epidemiology was assessed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Plasmid profiling and localization of carbapenemase-encoding genes in clinical isolates and *E. coli* A15R transconjugants were investigated by S1-PFGE and Southern hybridization. Incompatibility groups of plasmids carrying carbapenemase genes in transconjugants were determined by PCR-based Replicon typing (PBRT).

**Results:** 250 nonrepetitive carbapenem non-susceptible enterobacterial isolates were collected during a two year period from 22 clinical microbiology laboratories located in 15 cities. 60,4 % were *K. pneumoniae* isolates followed by *E. cloacae* (33,2 %), *E. aerogenes* (4 %), *C. freundii* (1,6 %), *K. oxytoca* (0,4 %) and *P. mirabilis* (0,4 %). 34,4 % of isolates produced carbapenemases, of which VIM-1 was the most prevalent (59,3 %), followed by KPC-2 (22,1 %), OXA-48 (14 %) and NDM-1 (4,7 %). 99,6 % of isolates were multidrug resistant, showing high resistance rates to penicillins, penicillin + inhibitor combinations, cephalosporins, ciprofloxacin and trimetoprim-sulfamethoxazole, but variable resistance to

carbapenems and aminoglycosides. 98% of isolates were ertapenem non-susceptible and 22 % showed nonsusceptibility to imipenem and meropenem. Resistance rates to imipenem (16,3% vs. 1,2 %) and meropenem (15,1 % vs. 1,8 %) were higher in carbapenemase-producing isolates ( $p < 0,01$ ). Genes encoding resistance determinants to three or more classes of antibiotics were detected in 77 % of isolates. Genes encoding beta-lactamases ( $bla_{TEM}$  71,6 %,  $bla_{SHV}$  62,4 %,  $bla_{CTX-M-15}$  61,2 %,  $bla_{AmpC}$  2,8 %) and aminoglycoside modifying enzymes ( $aac(6')-Ib$  84,8 %,  $aph(3')-Ia$  70,0 % ,  $aac(3')-II$  65,2 %,  $aadA1$  47,6 %,  $ant2$  3,2 %,  $aac(3')-I$  2 %) were the most prevalent ones, followed by genes encoding resistance determinants to sulphonamides ( $sulI$  81,6 %,  $sulII$  36,8 %), plasmid mediated quinolone resistance ( $qnrB$  16,4 %,  $qnrA$ , 4,8 %,  $qnrS$  2 %), tetracyclines ( $tetD$  26,0 %,  $tetA$  20,0 %) and chloramphenicol ( $floR$  3,2 %,  $cmlA$  1,6 %). In *K. pneumoniae*, difference in gene expression was only observed in *ompK35* in carbapenemase non-producing isolates ( $p < 0,01$ ). In *E. cloacae*, reduced expression of *ompC* was detected in both carbapenemase producing and non-producing isolates, while increased expression of *acrB* gene was observed in carbapenemase non-producing isolates. PFGE genotyping revealed that *K. pneumoniae* isolates were distributed in 18 groups (KP-A – KP-R), *E. cloacae* in 22 (EC-A – EC-V), *E. aerogenes* in 9 (EA-A – EA-I) and *C. freundii* 3 (CF-A – CF-C). Spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* was not monoclonal, except for KPC-2 producing *K. pneumoniae*. Greater genetic variability of carbapenemase non-producing isolates was observed only in *E. cloacae*. Carbapenemase non-producing *K. pneumoniae* showed reduced genetic diversity due to successful spread of a single clone. Production of KPC-2 was detected in *K. pneumoniae* ST258 only. Production of OXA-48, VIM-1 and NDM-1 was detected in 6 sequence types, but ST15 and ST16 were the most prevalent ones. VIM-1 production in *E. cloacae* was detected in 4 sequence types, but 97,3 % were associated with ST92, ST105 and ST200. 88,7% of *K. pneumoniae* carbapenemase non-producing isolates were identified as ST437. Plasmid location of carbapenemase-encoding genes was successfully determined in 95 % of carbapenemase producing isolates. Plasmids harbouring  $bla_{KPC-2}$  genes were identified as IncFIIs. Plasmids harbouring  $bla_{VIM-1}$  gene belonged to IncN and IncL/M and  $bla_{NDM-1}$  plasmids were identified as IncA/C, IncL/M and IncR.  $bla_{OXA-48}$  was detected on a ~60kb IncL/M plasmid in all transconjugants. Cotransfer of resistance to other classes of antibiotics was observed in case of  $bla_{VIM-1}$ ,  $bla_{KPC-2}$  and  $bla_{NDM-1}$  genes, but was not observed in case of  $bla_{OXA-48}$ .

**Conclusions:** Carbapenemase production was not the predominant mechanism of carbapenem resistance among carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae in Croatia during 2011 and 2012. Mechanisms underlying carbapenem non-susceptibility in non-carbapenemase producing isolates included permeability defects, caused by reduced expression of *ompK35* and *ompC* genes in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* respectively, and production of ESBLs. Carbapenem non-susceptible isolates were multidrug resistant, but showed varying levels of resistance to carbapenems. Carbapenemase-producing isolates showed greater resistance rates to imipenem and meropenem, while non-susceptibility to carbapenems in carbapenemase non-producing isolates was exhibited mostly as non-susceptibility to ertapenem. Polyclonal background of carbapenemase-producing isolates, except KPC-2, indicates that even though dissemination of carbapenemases is not monoclonal, it is mediated by a clonal spread of various epidemic clones. As opposed to scientific literature, spread of carbapenemase non-producing *K. pneumoniae* in Croatia is clonal by nature and is mediated by epidemic ST437 clone. Carbapenemase genes in carbapenem non-susceptible isolates are plasmid borne and are associated with broad host-range plasmids.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, carbapenem non-susceptible, carbapenemases, molecular epidemiology, plasmids, KPC-2, VIM-1, NDM-1, OXA-48

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	2
1.2. POVIJESNI PREGLED RAZVOJA REZISTENCIJE NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE U ENTEROBAKTERIJA	4
1.3. KARBAPENEMI	9
1.4. OTPORNOST ENTEROBAKTERIJA NA KARBAPENEME	12
1.4.1. <i>OTPORNOST NA KARBAPENEME MEHANIZMIMA KOJI NE UKLJUČUJU PROIZVODNJU KARBAPENEMAZA</i>	13
1.4.2. <i>OTPORNOST NA KARBAPENEME POSREDOVANA PROIZVODNjom KARBAPENEMAZA</i>	16
1.5. KLASIFIKACIJA KARBAPENEMAZA	18
1.5.1. <i>KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE A</i>	19
1.5.1.1. PLAZMIDNE KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE A	20
1.5.1.2. KROMOSOMSKE KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE A	22
1.5.2. <i>KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE B</i>	23
1.5.2.1. IMP (eng. „active on imipenem“)	24
1.5.2.2. VIM (eng. „Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase“)	24
1.5.2.3. NDM (eng. „New Delhi metallo-beta-lactamase“)	26
1.5.3. <i>KARBAPENEM-HIDROLIZIRAJUĆE BETA-LAKTAMAZE AMBLEROVE KLASE D</i>	28
1.6. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA KARBAPENEME	30
1.7. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA U ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME	32
1.8. ULOGA MOLEKULARNE EPIDEMIOLOGIJE U PREĆENJU ŠIRENJA ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME	35
1.9. ULOGA PLAZMIDA U ŠIRENJU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME	38
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>46</b>
3.1. POPIS MATERIJALA	47
3.1.1. <i>KEMIKALIJE I REAGENSI</i>	47
3.1.2. <i>ANTIBIOTICI I INHIBITORI BETA-LAKTAMAZA</i>	48
3.1.3. <i>HRANJIVE PODLOGE I MEDIJI</i>	50
3.1.4. <i>BOJE</i>	51
3.1.5. <i>STANDARDI MOLEKULSKIH MASA</i>	51
3.1.6. <i>ENZIMI, PROTEINI I PRIPADAJUĆI REAKCIJSKI PUFERI</i>	51
3.1.7. <i>SPECIFIČNE KOMERCIJALNE SMJESE REAGENCIJA – KOMPLETI</i>	52
3.1.8. <i>NUKLEINSKE KISELINE</i>	52
3.1.9. <i>PUFERI I OTOPINE</i>	60
3.1.10. <i>POTROŠNI MATERIJAL</i>	60
3.1.11. <i>UREĐAJI</i>	61
3.2. BAKTERIJSKI IZOLATI UKLJUČENI U STUDIJU	62
3.3. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA NA ANTIBIOTIKE	62
3.4. FENOTIPSKA DETEKCIJA PROIZVODNJE BETA-LAKTAMAZA	64
3.5. DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE	67
3.5.1. <i>IZOLACIJA UKUPNE BAKTERIJSKE DNA</i>	67
3.5.2. <i>LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)</i>	67
3.5.3. <i>ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA</i>	69
3.6. MJERENJE EKSPRESIJE GENA KOJI KODIRAJU EFLUKS PUMPE I PORINSKE KANALE	71
3.6.1. <i>IZOLACIJA UKUPNE BAKTERIJSKE RNA</i>	71
3.6.2. <i>OBRNUTO PREPISIVANJE RNA (REVERZNA TRANSKRIPCIIJA)</i>	72
3.6.3. <i>KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU</i>	73
3.7. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA	75

3.7.1. GEL ELEKTROFOREZA U IZMJENIČNOM ELEKTRIČNOM POLJU	75
3.7.2. MLST	77
3.8. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA	78
3.8.1. KONJUGACIJA	78
3.8.2. GEL ELEKTROFOREZA U IZMJENIČNOM POLJU NAKON RAZGRADNJE UKUPNE BAKTERIJSKE DNA SI-NUKLEAZOM	79
3.8.3. HIBRIDIZACIJA DNA METODOM PO SOUTHERN-U	80
3.8.4. KLASIFIKACIJA PLAZMIDA PREMA SKUPINAMA INKOMPATIBILNOSTI	82
3.9. STATISTIČKA ANALIZA	82
<b>4. REZULTATI</b>	<b>83</b>
4.1. BAKTERIJSKI IZOLATI	84
4.2. IDENTIFIKACIJA PROIZVODNJE BETA-AKTAMAZA FENOTIPSKIM METODAMA I DETEKCIJOM GENA	86
4.3. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA	88
4.4. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA NA ANTIBIOTIKE	106
4.5. DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE	115
4.6. MJERENJE EKSPRESIJE GENA KOJI KODIRAJU EFLUKS PUMPE I PORINSKE KANALE	121
4.7. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA	124
4.7.1. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA U IZOLATIMA KOJI PROIZVODE KARBAPENEMAZE	124
4.7.2. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA U TRANSKONJUGATIMA	129
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>137</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>164</b>
<b>POPIS LITERATURE</b>	<b>167</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>190</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	<b>192</b>
<b>BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	<b>193</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. ENTEROBACTERIACEAE

Suvremena klinička praksa nezamisliva je bez uporabe antibiotika u liječenju bakterijskih infekcija. Zbog niske toksičnosti, visoke baktericidnosti i širokog spektra djelovanja, beta-laktamski antibiotici se najčešće koriste u liječenju bakterijskih infekcija (1). Sve zastupljenija rezistencije na antibiotike, poglavito na beta-laktame, postaje sve veći problem na globalnoj razini. Infekcije rezistentnim sojevima rezultiraju povećanim morbiditetom, smrtnošću i povećanim troškovima liječenja (2). Posljednja dva desetljeća 20. stoljeća pozornost medicinske struke i farmaceutske industrije bila je usmjerena na problem širenja rezistentnih Gram-pozitivnih bakterija, prvenstveno meticilin-rezistentnih stafilokoka i vankomicin-rezistentnih enterokoka (3). Početkom 21. stoljeća pažnja se vraća na Gram-negativne bakterije, a sve veću zabrinutost izaziva pojava višestruko rezistentnih enterobakterija (od eng. „multiple drug resistant“, MDR).

Enterobakterije su najučestaliji uzročnici bolničkih i izvanbolničkih infekcija u pacijenata svih uzrasta (4). Porodica *Enterobacteriaceae* je heterogena taksonomska skupina Gram-negativnih bakterija iz koje dolazi najveći broj medicinskih važnih bakterijskih vrsta. Porodicu sačinjava nekoliko stotina vrsta iz pedesetak rodova. Enterobakterije su široko rasprostranjene i sveprisutne bakterije i sastavni su dio mikrobiote tla, voda, biljaka, te ljudske i animalne mikroflore. Unatoč obimu i kompleksnosti ove porodice, relativno mali broj vrsta su ljudski patogeni. Kao patogeni uzrokuju širok spektar infekcija od čega se najviše ističu infekcije mokraćnog sustava, bakterijemije i niz infekcija probavnog sustava (5). Često se izoliraju iz apscesa, uzročnici su meningitisa i kožnih infekcija, poglavito rana, a nekolicina bakterijskih vrsta je čest uzročnik bolničkih infekcija. Enterobakterije poput *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Yersinia pestis* obligatni su patogeni, dok su bakterijske vrste poput *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* uglavnom sastavni dio mikrobiote crijeva, u manjoj mjeri su zastupljene u usnoj šupljini i spolnom sustavu, no rijetko čine mikrobiotu drugih dijelova tijela, gdje se uglavnom pojavljuju kao oportunistički patogeni.

Čak 80 % kliničkih izolata Gram-negativnih bakterija otpada na enterobakterije (5, 6). Vrsta *E. coli* je najčešći uzročnik infekcija mokraćnog sustava, pokazuje visoku stopu rezistencije na ampicilin, no primjena amoksisilina s dodatkom klavulanske kiseline u liječenju polučuje dobre rezultate jer klavulanska kiselina inhibira djelovanje većine penicilinaza širokog spektra i većinu beta-laktamaza proširenog spektra (eng. “ extended-spectrum beta-lactamases“, ESBL). Kombinacija s klavulanskom kiselinom ograničava

primjenu amoksicilina u visokim dozama kakve su potrebne pri liječenju teških infekcija. Vrsta *Proteus mirabilis* pretežito izaziva izvanbolničke infekcije i prirodno je osjetljiva na sve beta-laktamske antibiotike Gram-negativnog spektra djelovanja. Rezistencija vrste *P. mirabilis* na beta-laktamske antibiotike u stalnom je porastu, rezistencija na ko-trimoksazol je prilično česta, a bilježi se i rezistencija na ciprofloksacin, te aminoglikozide poput amikacina i gentamicina. Bakterije *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter* spp. česti su uzročnici bolničkih infekcija i dugi niz godina pokazuju visoku stopu rezistencije. Vrsta *K. pneumoniae* je prirodno rezistentna na ampicilin, no rezistencija na ostale klase beta-laktamskih antibiotika javlja se kao stečena rezistencija uzrokovana obimnom izlaganju antibioticima. *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i *Serratia* spp. su enterobakterije koje posjeduju inducibilne cefalosporinaze što ih čini rezistentnima na ampicilin, ko-amoksiklav i cefalosporine prve generacije. Divlji tipovi su uglavnom osjetljivi na cefalosporine treće generacije, no rezistencija se može javiti tokom terapije kao posljedica deregulacije kontrole ekspresije gena koji kodiraju kromosomske cefalosporinaze (7, 8).

S obzirom da su važan dio crijevne mikrobiote, enterobakterije su često izložene antibioticima. Crijevna mikrobiota je dinamičan rezervoar koji sačinjavaju brojne bakterijske vrste. Zbog česte primjene antibiotika i prijenosa bakterija fekalno-oralnim putem, crijevna mikrobiota je milje koji pogoduje razvoju rezistencije na antibiotike. Seleksijski pritisak prouzrokovan primjenom antibiotika pogoduje selekciji rezistentnih mutanti ili pak omogućuje prihvaćanje gena rezistencije iz drugih bakterijskih vrsta koje su često intrinzički rezistentne na određene antibiotike (9, 10).

Posebnu pozornost izazivaju enterobakterije rezistentne na karbapeneme kod kojih se rezistencija javlja kao posljedica proizvodnje karbapenem-hidrolizirajućih beta-laktamaza. Karbapenemi su parenteralni baktericidni beta-laktamski antibiotici širokog spektra djelovanja i smatraju se antibioticima posljednje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim enterobakterijama rezistentnim na cefalosporine i kinolone. Rezistencija na karbapeneme uvelike smanjuje izbor antibiotika koji se mogu primijeniti u liječenju teških infekcija (4, 11). Kolistin, tigeciklin i poneki aminoglikozidi, i dalje pokazuju određenu antibakterijsku aktivnost u uvjetima *in vitro*, no karakterizira ih smanjena efikasnost i nepovoljniji sigurnosni profil. Infekcije izazvane enterobakterijama rezistentnim na karbapeneme često se vežu s rizičnim faktorima poput liječenja u jedinicama intenzivne njege, mehaničkom ventilacijom, kateterizacijom, transplantacijom, terapijom cefalosporinima proširenog spektra i prethodnom kolonizacijom. Stopa smrtnosti dostiže 40 % u slučajevima teških infekcija poput bolničkih upala pluća, sepsi, infekcija povezanih s



centralnim venskim kateterima, te infekcija mokraćnog sustava, abdomena i mjesta kirurških zahvata (12).

## **1.2. POVIJESNI PREGLED RAZVOJA REZISTENCIJE NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE U ENTEROBAKTERIJA**

Uskoro će se navršiti 90 godina otkako je sir Alexander Fleming otkrio penicilin i time započeo modernu eru primjene beta-laktamskih antibiotika. Daljnja istraživanja predvođena Howardom Floreyem i Ernestom Chainom rezultirala su razvojem postupaka koji su omogućili pročišćavanje penicilina i njegovu primjenu u kliničkoj praksi 1940. godine (13). Iako je penicilin G pokazivao antibakterijsko djelovanje na Gram-negativnim bakterijama u uvjetima *in vitro*, primjena penicilina u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama ušla je u kliničku praksu tek 1957. godine razvojem aminopenicilina. Aminopenicilini poput ampicilina, metecilina i tikarcilina su polusintetski penicilini proširenog spektra djelovanja čiju okosnicu čini 6-aminopenicilinska kiselina (13).

Već 1965. godine, osam godina nakon početka primjene ampicilina, opisana je prva beta-laktamaza koja je uspješno hidrolizirala ovaj antibiotik (14). Novootkrivena beta-laktamaza opisana je u izolata *E. coli* u Grčkoj i nazvana je TEM-1 prema pacijentici koja se zvala Temoniera. Nedugo nakon otkrića TEM-1 opisana je još jedna penicilinaza, sulfhidril varijanta 1 (SHV-1) u vrste *K. pneumoniae* (14). Kako bi se stalo na kraj rezistenciji na peniciline širokog spektra, posredovane proizvodnjom beta-laktamaza poput TEM-1 i SHV-1, u kliničku praksu uvode se cefalosporini treće generacije (15).

Cefalosporini proširenog spektra, poznatiji kao cefalosporini treće generacije pojavili su se na tržištu 1980-ih godina kao antibiotici iznimne učinkovitosti u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama (14). U početku je većina enterobakterija bila osjetljiva na ove antibiotike, no rezistencija se ubrzo javlja u enterobakterija koje prirodno luče male količine kromosomski kodirane beta-laktamaze AmpC (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* i *Serratia* spp.) (8). U divljih tipova ovih bakterijskih vrsta proizvodnja kromosomski kodiranih beta-laktamaza AmpC je inducibilna, no u mutiranih sojeva prekomjerna ekspresija enzima AmpC postaje konstitutivna. Cefalosporini treće generacije podložni su hidrolizi beta-laktamazama AmpC, no ne induciraju njihovu ekspresiju (8, 16). Pojavnost rezistencije na cefalosporine treće generacije nije dugo bila ograničena samo na vrste *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. i *C. freundii*, te se u sljedećoj fazi širenja rezistencije geni za beta-laktamaze AmpC mobiliziraju na plazmide. Na taj se način šire u bakterijske

vrste koje prirodno ne posjeduju kromosomski kodirane AmpC, poput *E. coli* i *K. pneumoniae* (17).

Paralelno s razvojem rezistencije na cefalosporine treće generacije posredstvom kromosomski kodiranih beta-laktamaza AmpC i njihovih plazmidnih varijanti javljaju se beta-laktamaze proširenog spektra koje imaju puno značajniju ulogu u širenju rezistencije na cefalosporine proširenog spektra. Prvi zabilježeni ESBL enzimi bili su mutirane varijante plazmidnih beta-laktamaza TEM-1 i SHV-1 (8). 1983. godine prva ESBL varijanta beta-laktamaze SHV opisana je u Njemačkoj, u izolatu *Klebsiella ozaenae*. Ova varijanta razlikovala se od SHV-1 u samo jednom aminokiselinskom ostatku (Ser – Gly 283) što je bilo dovoljno da poprimi ESBL karakteristike te je označena kao SHV-2 (14). U sljedećih 15 godina, izolati koji proizvode SHV-2 opisani su na svim naseljenim kontinentima što je direktna posljedica selekcijskog pritiska uzrokovano intenzivnom primjenom cefalosporina proširenog spektra (8). U Francuskoj je 1987. godine, u izolatima *K. pneumoniae*, opisana proizvodnja beta-laktamaze CTX-1 koja je vrlo efikasno hidrolizirala cefotaksim. Daljnjim istraživanjem otkriveno je da se radi o varijanti TEM-3 koja se od ne-ESBL varijante TEM-2 razlikuje u samo 2 aminokiselinska ostatka (8, 18). Smatra se da je možda prva ESBL varijanta beta-laktamaze TEM otkrivena 1982. godine u Liverpoolu, u *K. oxytoca*. Radilo se o izolatu koji je prikupljen za vrijeme bolničke epidemije uzrokovane *K. oxytoca* koja proizvodi TEM-1, no tijekom epidemije je mutirao i poprimio ESBL karakteristike. Ova je varijanta označena kao TEM-12 (19).

Iako cefalosporini treće generacije ne ulaze u hidrolitički spektar penicilinaza TEM-1 i SHV-1, do sada je detektirano više od 130 varijanti enzima TEM i SHV koji zbog promijenjenog aktivnog mjesta mogu hidrolizirati ove antibiotike (8, 14). ESBL varijante enzima TEM i SHV dominiraju 1980-ih i 1990-ih godina, a rezistencija uzima maha širenjem plazmida među sojevima vrste *K. pneumoniae* (8). Sojevi vrste *K. pneumoniae* koji proizvode ESBL uglavnom uzrokuju bolničke infekcije, poglavito na odjelima intenzivne skrbi (8).

Velika promjena u distribuciji ESBL-producirajućih sojeva javlja se početkom 2000-ih godina ubrzanim širenjem enzima CTX-M (8). Za razliku od ESBL varijanti enzima TEM i SHV, CTX-M nije mutirana verzija već poznatih penicilinaza širokog spektra, već svoje porijeklo vuče iz kromosomskih gena bakterija roda *Kluyvera* koje nisu klinički značajne (8, 14). Plazmidi s genima koji kodiraju ove beta-laktamaze uspješno se šire u izvanbolničke sojeve vrste *E. coli* i bolničke sojeve vrste *K. pneumoniae*. Prijelaz gena kromosomski kodiranih beta-laktamaza na plazmide opetovano se događao rezultirajući formiranjem 5 različitih skupina CTX-M enzima (skupine: 1,2,8,9,25) (8). Različite varijante enzima CTX-

M su različito geografski zastupljene. CTX-M-15 (skupina 1) uglavnom je rasprostranjena u Europi, Sjevernoj Americi, Bliskom Istoku i Indiji. CTX-M-14 (skupina 9) je uobičajena na područje Kine, Španjolske i Jugoistočne Azije, dok je CTX-M-2 rasprostranjena uglavnom u Argentini, Izraelu i Japanu (8, 14).

Geni koji kodiraju ESBL enzime nalaze se na velikim plazmidima, često zajedno s genima za rezistenciju na kinolone, aminoglikozide, trimetoprim i sulfonamide (20, 21) Zbog višestruke rezistencije sojeva koji proizvode ESBL i njihove tendencije da kontinuirano šire postojeći spektar rezistencije, liječenje bolničkih infekcija predstavlja izazov, pogotovo kod teških bolesnika, zbog ograničenog izbora djelotvornih antibiotika (20, 21).

Zbog rasta prevalencije višestruko rezistentnih, ESBL-producirajućih enterobakterija povećava se uporaba karbapenema (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) (8, 15). Karbapenemi se počinju primjenjivati u kliničkoj praksi 1985. godine (8). Karakterizira ih iznimna antibakterijska aktivnost i stabilnost koja proizlazi iz otpornosti na hidrolizu većinom poznatih beta-laktamaza, uključujući ESBL i AmpC (4). Karbapenemi zadržavaju antibakterijsku učinkovitost u sljedećih 20 godina, tijekom kojih je pojavnost enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme, sve do 2005. godine, bila iznimno niska (4, 8). U ovom periodu, većina je slučajeva smanjene osjetljivosti na karbapeneme zabilježena u vrste *K. pneumoniae* i predstavnika roda *Enterobacter*. Nasumična pojavnost rezistencije na karbapeneme bila je malog dosega i uglavnom je proizlazila iz mutacija koje su rezultirale smanjenom propusnošću i otežanom penetracijom karbapenema u bakterijsku stanicu (4). Smanjena koncentracija karbapenema u bakterijskoj stanici, u kombinaciji s proizvodnjom enzima ESBL i/ili AmpC, dovodi do pojave smanjene osjetljivosti na karbapeneme pri čemu gubitak antibakterijske aktivnosti ertapenema najviše dolazi do izražaja (4). Sporadična pojavnost i ograničeno širenje vrlo vjerojatno se javljaju kao posljedica smanjene kompetitivnosti prouzrokovane negativnim učinkom gubitka funkcionalnih porinskih kanala (4, 8).

Karbapenemaze, beta-laktamaze koje efikasno hidroliziraju karbapeneme, prepoznate su kao globalni problem 15-ak godina nakon uvođenja karbapenema u kliničku praksu. Rezistencija na karbapeneme u enterobakterija koja se javlja kroz proizvodnju karbapenem-hidrolizirajućih beta-laktamaza od većeg je značaja jer plazmidni smještaj gena koji kodiraju karbapenemaze omogućuje horizontalno širenje rezistencije, pojavnost izolata koji proizvode karbapenemaze nije nasumična i nestabilna, a širenje je često klonskog karaktera (4). Proizvodnja plazmidnih karbapenemaza prvi je puta opisana krajem 1980-ih godina u Japanu, u izolatu *Pseudomonas aeruginosa* (22). Širenje enterobakterija koje proizvode

karbapenemazu IMP diljem Japana uslijedilo je nedugo nakon prvog opisa. Iako je raširenost enterobakterija s genom *bla*<sub>IMP</sub> tokom vremena poprimila globalne razmjere, njihova je prevalencija ostala vrlo niska, a endemski su karakter zadržale samo na području Japana i Tajvana (23).

Era karbapenemaza započinje krajem 1990-ih godina. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) su 1996. godine opisani prvi izolati *K. pneumoniae* koji proizvode KPC (eng. "Klebsiella pneumoniae carbapenemase", KPC), a već 1997. godine u Italiji je opisana proizvodnja karbapenemaze VIM-1 (eng. „Verona Integron-encoded metallo-beta-lactamase“, VIM), u izolatu *P. aeruginosa* (4, 24).

Prvi izolati *K. pneumoniae* koji su proizvodili beta-laktamazu KPC opisani su u Sjevernoj Karolini, nakon čega se KPC-producirajuća *K. pneumoniae* ubrzano širi diljem istočne obale SAD-a zahvaljujući klonskom širenju *K. pneumoniae* klonskog tipa ST258 (4, 25). Do 2006. godine KPC-producirajuća *K. pneumoniae* proširila se diljem SAD-a, a širenje je zabilježeno u Izraelu, Grčkoj, Italiji, Švedskoj, Norveškoj, Poljskoj, Kini, Brazilu, Južnoj Koreji i Kanadi nakon čega su uslijedili opisi iz drugih zemalja diljem svijeta (4, 8, 26). Prvi slučaj KPC-producirajuće *K. pneumoniae* opisan je u Hrvatskoj 2011. godine u studiji Bedenić i suradnika iz 2012. godine (27). Gen *bla*<sub>KPC-2</sub> detektiran je u *K. pneumoniae* klonskog tipa ST37, no nije bio odgovoran za daljnje širenje gena *bla*<sub>KPC-2</sub> u Hrvatskoj (27, 28).

Od otkrića karbapenemaze VIM u Italiji, ubrzo su uslijedili opisi izolata iz drugih europskih država. 2003. godine VIM-producirajuće enterobakterije počinju se širiti Grčkom, a nedugo zatim, opisane su bolničke epidemije u Španjolskoj i sporadični slučajevi u ostatku Europe koji su uglavnom bili povezani s uvozom VIM-1 i VIM-2 producirajućih *K. pneumoniae* iz Grčke (4). Sporadična pojava VIM-1 izolata enterobakterija u Hrvatskoj bilježi se od 2007. godine, a prva bolnička epidemija VIM-1-producirajućih *E. cloacae* opisana je u KBC Split 2012. godine (29).

Dok je svjetska pozornost bila usmjerena na širenje enterobakterija koje proizvode karbapenemaze VIM i KPC, tiha epidemija izazvana enterobakterijama koje proizvode karbapenemazu OXA-48 (eng. „oxacillinase-48“, OXA-48) uzima sve veći zamah. Ova, ponešto drugačija karbapenemaza suptilnijeg djelovanja, prvi je puta opisana u Turskoj, u izolatu *K. pneumoniae*. U početku je širenje enterobakterija s genom *bla*<sub>OXA-48</sub> bilo ograničeno na Bliski istok i Sjevernu Afriku, no od 2007. godine opisuju se prvi slučajevi u Europi: Belgiji, Irskoj, Francuskoj, Španjolskoj i Nizozemskoj (30). U Italiji je širenje OXA-48-producirajućih enterobakterija jednim djelom uzrokovano migracijom izbjeglica iz Sjeverne

Afrike, poglavito onih iz Libije (31). Uskoro je širenje OXA-48-producirajućih enterobakterija zahvatilo cijelo Sredozemlje i ostatak Europe (30). OXA-48-producirajuća *K. pneumoniae* pojavila se u Hrvatskoj u drugoj polovici 2012. godine, a izolati *K. pneumoniae* koji su identificirani u ranoj fazi širenja karbapenemaze OXA-48 u Hrvatskoj opisani su u znanstvenom radu Jelić i suradnika (32) koji je objavljen u sklopu ovog rada.

Od 2008. godine, enterobakterije koje proizvode karbapenemazu NDM-1 (eng. „New Delhi metallo-beta-lactamase“, NDM) sve se češće opisuju u Europskim zemljama, uglavnom u kontekstu migracija i putovanja vezanih uz Indijski potkontinent (4). Izolati enterobakterija koje proizvode NDM prvotno su opisani u Ujedinjenom Kraljevstvu, Belgiji, Francuskoj, Norveškoj i Švedskoj. Slučajevi uvoza opisani su u Australiji, Kanadi, Japanu i SAD-u i vezani su uz pacijente koji su prethodno bili hospitalizirani u Indiji, Pakistanu i Bangladešu (2, 8). Prvi slučaj *K. pneumoniae* koja proizvodi NDM-1 u Hrvatskoj zabilježen je 2009. godine (33).

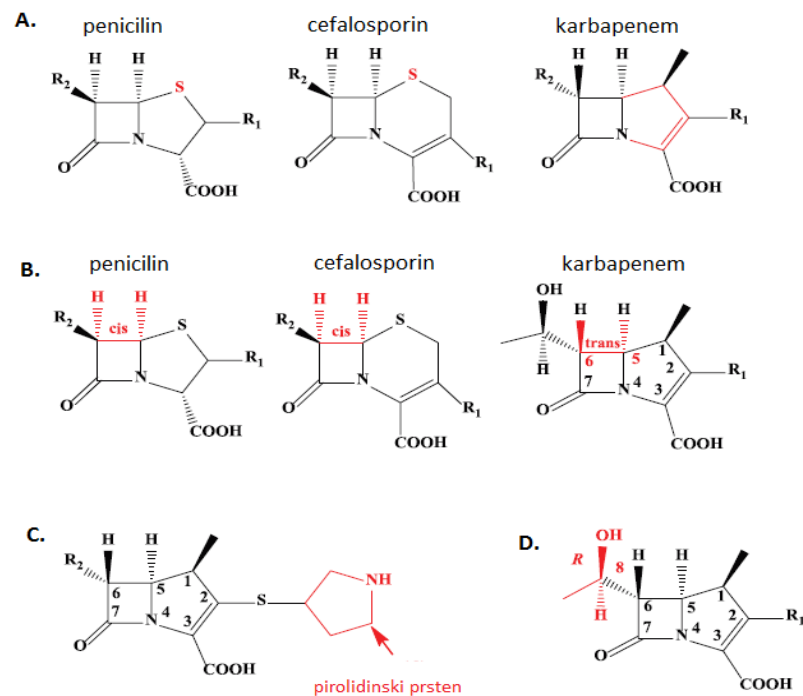
### 1.3. KARBAPENEMI

Karbapenemi su najmoćnija klasa beta-laktamskih antibiotika koji se, zbog djelotvornosti i otpornosti na hidrolitičko djelovanje enzima ESBL i beta-laktamaza AmpC, koriste kao antibiotici posljednje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim enterobakterijama (11). Okosnica su empirijske terapije u liječenju teških infekcija poput bolničkih upala pluća, teških infekcija mokraćnog sustava i intraabdominalnih infekcija, febrilne neutropenije, sepse, kožnih infekcija, meningitisa i komplikacija izazvanih cističnom fibrozom. Karakterizira ih širok spektar djelovanja koji podjednako obuhvaća Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a zbog sve veće prevalencije rezistencije na peniciline, cefalosporine, fluorokinolone i aminoglikozide, njihova primjena u kliničkoj praksi posljednjih dvadesetak godina postaje sve učestalija (34).

Kao i ostali beta-laktamski antibiotici, okosnicu karbapenema čini četveročlani beta-laktamski prsten koji je sa sekundarnim, peteročlanim tiazolidinskim prstenom, spojen preko atoma dušika i susjednog tetrahedralnog ugljikovog atoma (35). Karbapenemi strukturno nalikuju penicilinima, od kojih se prvenstveno razlikuju u strukturi sekundarnog prstena, u kojem je atom sumpora supstituiran atomom ugljika na poziciji 1 i po prisutnosti nezasićene veze između ugljikovih atoma na pozicijama 2 i 3 (Slika 1.) (34). Razlike među karbapenemima proizlaze iz strukture bočnih lanaca vezanih za okosnicu. Bočni lanci karbapenema najviše doprinose njihovom antibakterijskom djelovanju i zaslužni su za stabilnost i otpornost na hidrolizu. Otpornost na hidrolizu beta-laktamazama postignuta je supstitucijom atoma sumpora na poziciji C1. Uz navedeno, otpornosti doprinosi i hidroksietilna grupa na položaju 6, te *trans* konfiguracija veze u beta-laktamskom prstenu između C5 i C6 (Slika 1.) (11). R konfiguracija na C8 doprinosi većoj potenciji karbapenema, dok je pirolidinska skupina ertapenema, meropenema i doripenema odgovorna za širok spektar antibakterijskog djelovanja. U isto vrijeme, struktura bočnih lanaca uzrokuje i određenu funkcionalnu nestabilnost. Velik broj karbapenema nije ušao u kliničku upotrebu zbog nestabilnosti i to je jedan od glavnih razloga zašto imaju najmanji broj predstavnika od svih beta-laktamskih antibiotika (Slika 1., Slika 2.) (34).

Kao i svi drugi beta-laktamski antibiotici, karbapenemi se vežu i acilacijom inhibiraju tzv. „proteine koji vežu penicilin“ (eng „penicillin-binding proteins“, PBP). PBPI uglavnom spadaju u transpeptidaze, enzime koji su ključni za elongaciju i umrežavanje peptidoglikana u staničnoj stjenici Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Inhibicijom PBPa

onemogućuje se izgradnja stanične stijenke što dovodi do nakupljanja oštećenja, lize i smrti bakterijske stanice (34).

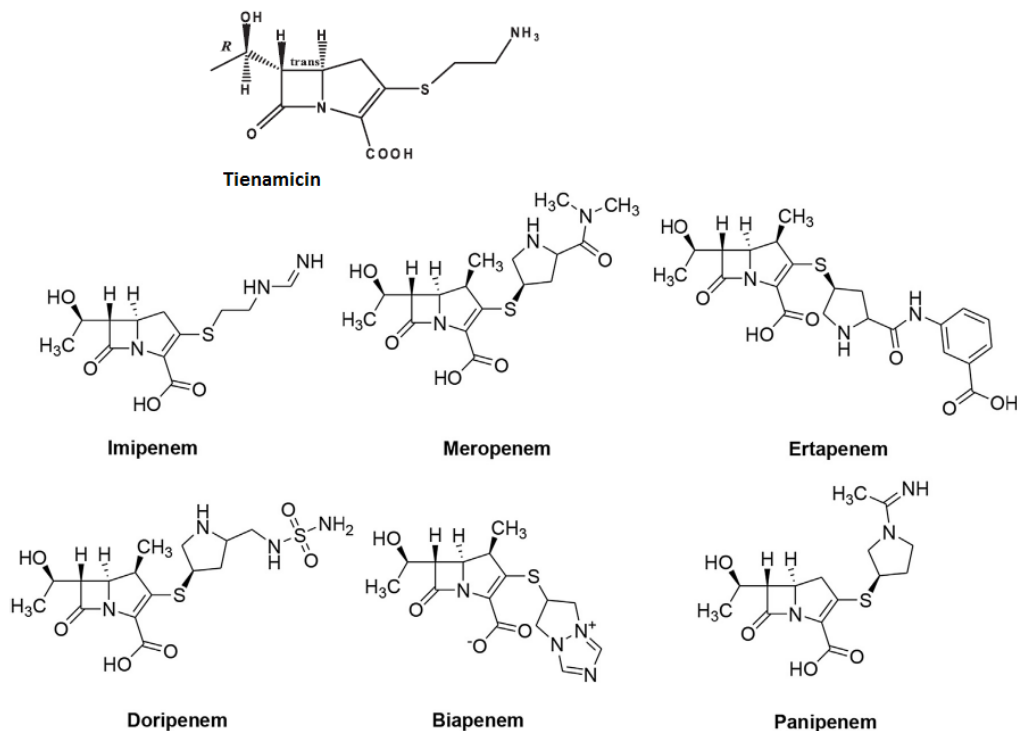


**Slika 1.** (A.) Okosnice penicilina, cefalosporina i karbapenema. (B.) *Trans* konfiguracija C5-C6 veze karbapenema povećava antimikrobnu učinkovitost. (C.) Pirolidinski prsten doprinosi stabilnosti i antimikrobnom spektru karbapenema. (D.) *R* konfiguracija hidroksietilne skupine povećava antimikrobnu učinkovitost karbapenema.

Karbapenemi se velikim afinitetom vežu za širok spektar PBPa. Imipenem se najvećim afinitetom veže za PBP2, PBP1a i 1b, dok je afinitet vezanja za PBP3 vrlo nizak. Meropenem se velikim afinitetom veže za PBP2, 3 i 4 dok se ertapenem s najvećim afinitetom veže za PBP2 i 3 u vrste *E. coli*, te za PBP1a, 1b, 4 i 5 (34). Od svih beta-laktamskih antibiotika, karbapenemi najefikasnije ispoljavaju antibakterijsko djelovanje na Gram-negativnim bakterijama. Da bi do njega uopće moglo doći kod Gram-negativnih bakterija, moraju proći kroz vanjsku membranu kako bi došli do periplazmatskog prostora u kojemu se odvija sinteza peptidoglikana. Karbapenemi zbog svoje strukture ne mogu slobodno difundirati kroz vanjsku membranu, već njihova penetracija ovisi o prolasku kroz transmembranske kanale vanjske membrane tzv. porinske kanale. Relativno lak prolazak kroz porinske kanale, visok afinitet vezanja za PBPe i otpornost na hidrolizu ESBL enzimima i beta-laktamazama AmpC razlozi su zašto karbapenemi posjeduju tako širok spektar aktivnosti u odnosu na ostale antibiotike (11).

Tienamicin, prvi opisani predstavnik karbapenema, otkriven je 1976. godine. Iako je bio antibiotik širokog spektra djelovanja, otporan na hidrolitičko djelovanje beta-laktamaza, bio je podložan alkalnoj hidrolizi i nestabilan u vodenim otopinama. Imipenem je stabilniji N-formimidoil polusintetski derivat tienamicina koji je u kliničku praksu uveden 1985. godine. Imipenem i njegov bliski srodnik panipenem zadržali su pozitivne aspekte tienamicina, no podložni su deaktivaciji bubrežnom dehidropeptidazom-I (DHP-I) zbog čega se moraju davati zajedno u formulaciji s cilastatinom, inhibitorom DHP-I (11). S vremenom su razvijeni novi oblici karbapenema poput ertapenema, meropenema i doripenema. Zbog dodatka metilne skupine na poziciji C1 postali su otporniji na deaktivaciju s DHP-I, a pirolidinska skupina na C2 omogućuje im širi spektar djelovanja. Svi dostupni karbapenemi imaju vrlo nisku bioraspoloživost ukoliko se uzimaju oralno zbog slabe gastrointestinalne apsorpcije. Svi se karbapenemi primjenjuju intravenozno, dok se imipenem-cilastatin i ertapenem mogu aplicirati intramuskularno. Kao i svi drugi beta-laktamski antibiotici, izlučuju se renalnom ekskrecijom. Sigurnosni profil karbapenema sličan je onom ostalih beta-laktamskih antibiotika, a u nekim je aspektima i povoljniji. Najučestalije nuspojave su proljev, mučnina i povraćanje. Konvulzivni napadaju mogući su pri većima dozama, u pacijenata s bubrežnom disfunkcijom ili ozljedama centralnog živčanog sustava (11, 35).





**Slika 2.** Strukturni prikaz karbapenemskih antibiotika.

#### 1.4. OTPORNOST ENTEROBAKTERIJA NA KARBAPENEME

Sve češća primjena karbapenema u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim enterobakterijama rezistentnim na cefalosporine proširenog spektra neminovno je rezultirala pojavom i širenjem rezistencije na karbapeneme (8). Pojava rezistencije na karbapeneme u enterobakterija može se ispoljiti kroz proizvodnju karbapenemaza ili se može javiti kroz kombinirano djelovanje beta-laktamaza slabe karbapenemazne aktivnosti u uvjetima smanjene koncentracije karbapenema (4, 36, 37). Zbog navedenog, u znanstvenoj literaturi se često javljaju termini poput „enterobakterije rezistentne na karbapeneme“ („carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*“, CRE), „enterobakterije smanjene osjetljivosti na karbapeneme“ („carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae*“, CNSE) i „enterobakterije koje proizvode karbapenemaze“ („Carbapenem-producing *Enterobacteriaceae*“, CPE). Pojmovi „enterobakterije rezistentne na karbapeneme“ i „enterobakterije smanjene osjetljivost na karbapeneme“ odnose se na sve enterobakterije koje su rezistentne ili pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme neovisno o tome proizvode li karbapenemaze. S obzirom na to da očito postoji preklapanje u terminologiji, važno ih je razlikovati jer CRE i CNSE opisuju

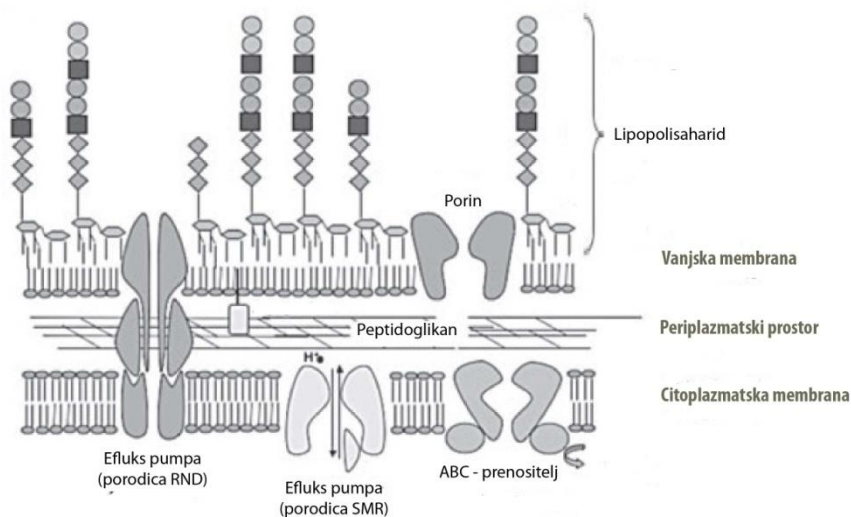
fenotip, dok CPE implicira mehanizam rezistencije koji se temelji na proizvodnji karbapenemaza (4, 15).

#### 1.4.1. OTPORNOST NA KARBAPENEME MEHANIZMIMA KOJI NE UKLJUČUJU PROIZVODNJU KARBAPENEMAZA

Mehanizmi koji ne uključuju proizvodnju karbapenemaza odnose se na proizvodnju ESBL enzima i beta-laktamaza AmpC u uvjetima smanjene koncentracije karbapenema u bakterijskoj stanici. Proizvodnja ESBL enzima uglavnom je posljedica stjecanja plazmida koji posjeduje gen *bla*<sub>ESBL</sub>, dok se rezistencija na karbapeneme izazvana beta-laktamazom AmpC uglavnom javlja kao posljedica hiperekspresije kromosomskog gena *bla*<sub>AmpC</sub>. Obje vrste beta-laktamaza vrlo slabo hidroliziraju karbapeneme, no u kombinaciji sa smanjenom propusnosti vanjske membrane enterobakterija dovode do razvoja rezistencije na karbapeneme (23). Karbapenemi u periplazmatski prostor dospijevaju putem porinskih kanala, zbog čega sve promjene vezane uz te transmembranske strukture imaju direktan utjecaj na koncentraciju karbapenema u bakterijskoj stanici. Na koncentraciju karbapenema u bakterijskoj stanici utječu i tzv. efluks pumpe (eng. „efflux pump“) koje povećanom aktivnošću, odnosno hiperprodukcijom mogu uzrokovati smanjenje njihove koncentracije. Mutacije u genima koji kodiraju PBPe mogu doprinijeti razvoju rezistencije na karbapeneme, no to je mehanizam koji tek u manjoj mjeri doprinosi ukupnoj pojavnosti rezistencije (23). Iako je vanjska membrana enterobakterija relativno nepropusna, prožeta je transmembranskim proteinima (eng. “outer membrane protein“, OMP) koji omogućuju asimilaciju nutrijenata te izlučivanje metabolita i toksina (38). S obzirom na strukturu, OMP-ovi mogu biti lipoproteini koji su usidreni u fosfolipidni dvosloj ili su integralni membranski proteini koji imaju ulogu hidrofilnih transmembranskih pora (Slika 3.). Ovi transmembranski kanali mogu biti nespecifični, te difuzijom propuštati hidrofilne spojeve ili pak mogu specifično propuštati samo određene spojeve. Konsenzus je da se nespecifični transmembranski kanali zovu porini (38). Većina studija na porinskim kanalima provedena je na enterobakterijama poput *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter* spp. U svih je navedenih vrsta otkriven velik broj porina, no kod većine su samo dva dominantna. U vrste *E. coli* radi se o porinima OmpF i OmpC, u vrste *K. pneumoniae* se najviše ističu porini OmpK35 i OmpK36, dok su OmpC i ompF dominantni porini u vrste *E. cloacae* (38-41). Smanjena propusnost vanjske membrane može se javiti kao posljedica mutacija u genima koji kodiraju proteine porinskih kanala ili u genima koji

reguliraju njihovu ekspresiju. Mutacije strukturnih gena mogu uzrokovati smanjenu funkcionalnost porinskih kanala ili pak potpuni gubitak funkcije (42). Mutacije u regulacijskim genima mogu rezultirati smanjenjem razine ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale što pak rezultira smanjenjem sinteze ili potpunim gubitkom porinskih kanala (42) .

Efluks pumpe Gram-negativnih bakterija, poglavito one iz porodice RND („eng. Resistance-nodulation-division“), imaju važnu ulogu u razvoju stečene i intrinzičke rezistencije na širok spektar različitih klasa antibiotika (43). Najpoznatija efluks pumpa u enterobakterija zasigurno je tripartitni sustav AcrAB-TolC. Ovaj je sustav vrlo dobro opisan u enterobakterija *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter* spp. (44, 45). AcrAB kodiraju geni operona *acrRAB*. U spomenutom operonu, *acrR* je represor dok *acrA* i *acrB* kodiraju periplazmatske lipoproteine koji zajedno čine strukturu veličine 40 kDa (44, 46) (Slika 3.). Efluks pumpe MDR (eng. „Multidrug resistance“, MDR) poput AcrAB-TolC imaju aktivnu ulogu u razvoju rezistencije enterobakterija na širok spektar lipofilnih i amfifilnih spojeva poput boja, deterdženata i različitih toksina. Uz navedeno, ove su strukture odgovorne za pojavu rezistencije na tetracikline, kloramfenikol, fluorokinolone, eritromicin i različite beta-laktame (43, 45). Iako se efluks pumpe vežu uz pojavu rezistencije na beta-laktamske antibiotike, što je posebice vidljivo u cefoksitina, iz rezultata dosadašnjih istraživanja efluks pumpe nisu prepoznate kao ključan čimbenik u razvoju rezistencije na karbapeneme (40, 44).



**Slika 3.** Shematski prikaz građe stanične stjenke enterobakterija i membranskih struktura uključenih u regulaciju propusnosti bakterijske stanice. Slika preuzeta iz Mayers i suradnika (47), uz preinake.

Iako ne postoji precizna definicija ESBL enzima, ovu skupinu enzima čine sve beta-laktamaze iz Amblerove klase A koje hidroliziraju peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije, te aztreonam pri čemu ih inhibiraju klasični inhibitori beta-laktamaza poput klavulanske kiseline (14). ESBL su heterogena skupina enzima koji međusobno dijele od 20 do više od 99% sličnost. Prvi opisani ESBL enzimi bile su varijante beta-laktamaza TEM-1/2 i SHV-1 čiji se prošireni spektar aktivnosti javio kao posljedica nekolicine mutacija (14, 48). Danas je poznato više od 130 ESBL varijanti beta-laktamaza TEM i SHV, većina ih hidrolizira ceftazidim, dok samo manji udio hidrolizira i cefotaksim. Iako su TEM i SHV ESBL varijante beta-laktamaze prve opisane, u ESBL enzime ubrajaju se i ceftazidimaze PER, VEB, TLA-1 i GES te cefotaksimaze SFO-1, BES-1 i CTX-M. Beta-laktamaze CTX-M su najrašireniji ESBL enzimi. Prvi puta su opisane u drugoj polovici 1980-ih godina, no dramatično širenje uočeno je tek nakon 1996 (48).

Za razliku od ESBL enzima, beta-laktamaze AmpC hidroliziraju cefalosporine treće generacije, no ne inhibira ih klavulanska kiselina. Bakterijske vrste poput *E. cloacae* prirodno sintetiziraju kromosomski kodirane, inducibilne beta-laktamaze AmpC, a rezistencija na cefalosporine treće generacija javlja se kao posljedica pojave mutanata koji konstitutivno hiperproduciraju ovaj enzim (14). Uz narušenu regulaciju ekspresije gena kromosomski kodirane beta-laktamaze AmpC, proizvodnja ovih enzima u enterobakterija povezuje se i sa stjecanjem plazmidnih varijanti ovih enzima. Većina plazmidnih varijanti gena *bla*<sub>AmpC</sub> u enterobakterija detektirana je u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*. Plazmidne varijante beta-laktamaze AmpC nastale su mobilizacijom kromosomskih AmpC iz vrsta *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morgani* i *Hafnia alvei* (49).

Rezistencija na karbapeneme koja se ispoljava kroz mehanizme koji ne uključuju proizvodnju karbapenemaza slabije je izražena i uglavnom se manifestira kao rezistencija na ertapenem (40, 50). Smanjenje propusnosti, a time i smanjenje koncentracije aktivne tvari u bakterijskoj stanici posljedica je gubitka porinskih kanala kroz smanjenje funkcionalnosti ili kroz općeniti gubitak gena koji kodiraju porinske kanale (26). Smatra se da je ovakav mehanizam ujedno nepovoljan i po samu bakterijsku stanicu jer se smanjenjem propusnosti narušava proces asimilacije hranjivih tvari i ekstrakcije metabolita čime se direktno utječe na kompetitivnost mutanata (4, 8). Zbog navedenog, smatra se da se ovakav vid rezistencije na karbapeneme javlja rijetko i sporadično jer smanjena kompetitivnost mutanata negativno utječe na njihov epidemijski potencijal (51). U isto vrijeme, ovakva rezistencija je često nestabilna i u nekoliko je navrata opisan njen reverzibilni karakter (8).

#### 1.4.2. OTPORNOST NA KARBAPENEME POSREDOVANA PROIZVODNOM KARBAPENEMAZA

Kao što je to slučaj i s ostalim beta-laktamskim antibioticima, najefikasniji i najdominantniji mehanizam rezistencije na karbapeneme u enterobakterija bazira se na proizvodnji beta-laktamaze (52). Stečene karbapenemaze su velika grupa strukturno raznolikih enzima u čiji hidrolitički spektar spada velik broj različitih beta-laktamskih antibiotika (53). Iako su ove beta-laktamaze poznatije pod imenom „karbapenemaze“, karbapenemi zapravo čine samo jedan dio hidrolitičkog spektra ovih enzima. Karbapenemaze hidroliziraju gotovo sve poznate beta-laktamske antibiotike i uglavnom su otporne na djelovanje klasičnih inhibitora beta-laktamaza. Iako naziv „karbapenem-hidrolizirajuće beta-laktamaze“ bolje opisuje ovu skupinu enzima, termin „karbapenemaza“ ostao je uvriježen u znanstvenoj literaturi (24).

Zbog širokog spektra djelovanja i plazmidne prirode karbapenemaze predstavljaju mnogo veći problem s epidemiološkog stajališta (12). U slučaju karbapenemaza, rezistencija na karbapeneme ne javlja se kao posljedica sinergijskog djelovanja nekoliko nestabilnih mehanizama rezistencije ograničenog dosega, već se radi o vrlo efikasnim enzimima. Rezistencija enterobakterija koje proizvode karbapenemaze nije ograničena samo na ertapenem, te su u većoj ili manjoj mjeri obuhvaćeni svi karbapenemi (4, 36). Epidemiologija enterobakterija koje proizvode karbapenemaze uvelike se razlikuje od epidemiologije enterobakterija koje proizvode ESBL enzime. Primarna razlika leži u klonskoj prirodi širenja karbapenemaza što se nedvojbeno može vidjeti u slučaju enzima KPC, te donekle u slučaju karbapenemaza VIM i NDM (36, 54). U slučaju ESBL-producirajućih enterobakterija, klonsko širenje gena rezistencije igra sporednu ulogu, a glavni pokretač širenja rezistencije je horizontalni prijenos gena među bakterijama iste ili različitih vrsta (55). Geni koji kodiraju karbapenemaze, u usporedbi s genima *bla*<sub>ESBL</sub> pronađeni su na puno manjem broju različitih plazmida i ostalih pokretnih genetičkih elemenata. Iz ovoga se može zaključiti da, u slučaju karbapenemaza, postoji puno izraženija sprega klonskog širenja i horizontalnog prijenosa gena koji kodiraju karbapenemaze (25, 55, 56). Plazmidni kontekst karbapenemaza nije bitan samo iz epidemiološke perspektive. Geni koji kodiraju karbapenemaze u većini su slučajeva povezani s plazmidima koji nose gene rezistencije na velik broj drugih klasa antibiotika. Prisutnost ovakvih plazmida u bakterijskoj stanici često uzrokuje pojavu višestruko rezistentnog fenotipa, kojeg uz rezistencije na karbapeneme, odnosno beta-laktame, karakterizira rezistencija na aminoglikozide, tetracikline, kloramfenikol, sulfonamide,

trimetoprim, kinolone itd. (57). Višestruko rezistentan fenotip enterobakterija koje proizvode karbapenemaze sužava izbor djelotvornih antibiotika u liječenju infekcija i nedvojbeno podiže stopu mortaliteta (53).

Iako karbapenemaze hidroliziraju karbapeneme, njihov hidrolitički spektar nije uniforman. Česta je pojava da izolati koji proizvode karbapenemaze prikazuju varijabilan profil rezistencije na karbapeneme koji se kreće u rasponu od osjetljivog do rezistentnog (58). Navedena varijabilnost primijećena je i među izolatima koji proizvode istu karbapenemazu. Izolati koji proizvode karbapenemazu OXA-48 uglavnom imaju najniže vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) karbapenema, slijede metalo-beta-laktamaze te na posljetku KPC-producirajući izolati, koje karakteriziraju najveće MIK vrijednosti (52). Niska razina rezistencije na karbapeneme, koja ponekad graniči s osjetljivošću, česta je pojava u izolata enterobakterija i primijećena je u slučaju svih karbapenemaza u vrste *K. pneumoniae*.

## 1.5. KLASIFIKACIJA KARBAPENEMAZA

Smatra se da su beta-laktamaze nastale evolucijom iz PBPa (10). Pretpostavka se bazira na činjenici da PBPi i beta-laktamaze dijele određenu sličnost s obzirom na konzerviranu strukturu aktivnog mjesta i tercijarnu strukturu enzima. Pretpostavlja se da su neki PBPi, zbog nasumičnih mutacija, brže od drugih PBPa vršili deacilaciju i uklanjali beta-laktame iz aktivnog mjesta. Takvi enzimi su pružali kompetitivnu prednost bakterijama pod selekcijskim pritiskom beta-laktamskih antibiotika. S vremenom je proces deacilacije postajao sve efikasniji, te su se takvi PBPi specijalizirali za hidrolizu beta-laktama, no izgubili su primarnu funkciju u sintezi peptidoglikana. Gubitkom primarne uloge nestala je i potreba da budu vezani za staničnu stjenku. Smatra se da PBPi postoje skoro od kako postoje bakterije, odnosno bakterijska stanična stjenka. Beta-laktamaze se javljaju puno kasnije, najvjerojatnije nakon formiranja metaboličkih procesa uključenih u sintezu beta-laktamskih spojeva, no puno prije upotrebe beta-laktamskih antibiotika u kliničkoj praksi. Većina beta-laktama u prirodnim uvjetima dopijeva u tlo iz aktinomiceta i ostalih bakterija (47). Očito je da bakterije koje žive u takvom okolišu imaju određenu kompetitivnu i evolucijsku prednost nad bakterijama koje ne proizvode beta-laktamaze. Većina „penicilinaza“ otkrivenih 1940-ih godina izolirana je iz bakterija tla kao što su *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp. i *Bacillus* spp.. Evolucija beta-laktamaza uzela je maha tek u zadnjih 60 godina. Dolazi do diverzifikacije i specijalizacije za pojedine beta-laktamske antibiotike što se posebno dobro vidi kroz gubitak homologije unatoč tome što je tercijarna struktura skoro svih beta-laktamaza ostala konzervirana (10, 47).

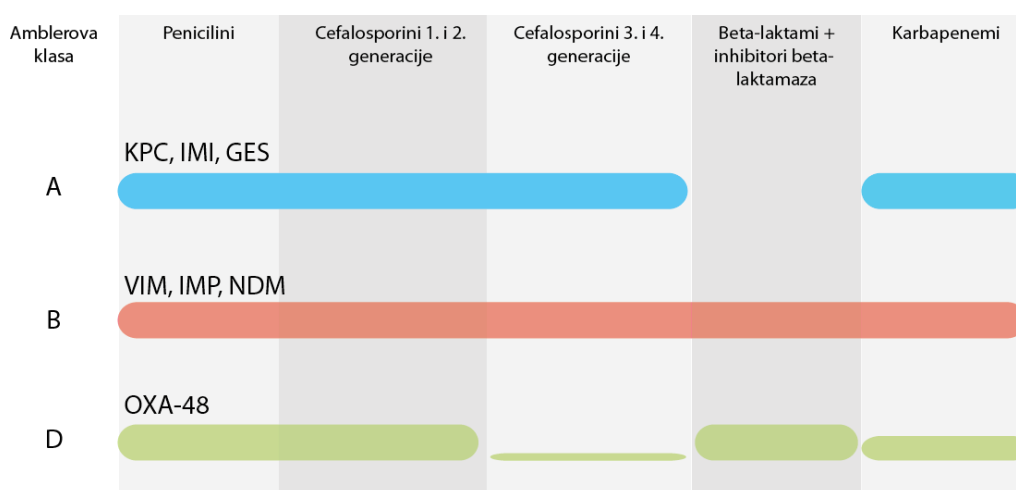
Velika šarolikost enzimskih karakteristika beta-laktamaza dugo je vremena izazivala poteškoće u njihovoj klasifikaciji (59). Beta-laktamaze se klasificiraju na temelju dva kriterija: funkcionalnih karakteristika i primarne strukture (59). Funkcionalna klasifikacija beta-laktamaza bazira se na kinetičkim parametrima hidrolitičkih enzimskih reakcija, te supstratnom i inhibicijskom profilu. U obzir se također uzimaju parametri poput molekulske mase enzima i izoelektričnih karakteristika (59). Funkcionalnom klasifikacijom obuhvaćene su 4 glavne skupine beta-laktamaza (10, 60).

Shemu funkcionalne karakterizacije predložila je Karen Bush i suradnici 1989. godine, a do 1995. godine ovakvom je shemom klasificirano više od 190 enzima. Zadnja preinaka ovog klasifikacijskog sustava izvršena je 2010 kojom se u obzir počela uzimati i primarna struktura enzima (24, 59).

Klasifikacijsku shemu baziranu na primarnoj strukturi beta-laktamaza prvi je puta predložio Ambler 1980. godine. Ovakva klasifikacija svrstava beta-laktamaze u 4 osnovne

klase: A, B, C i D. Beta-laktamaze klasa A, C i D su enzimi čiji se hidrolitički mehanizam bazira na serinu u aktivnom mjestu. Klasu B, tzv. metalo-beta-laktamaze, čine enzimi u čijem se aktivnom mjestu nalazi jedan ili dva cinkova iona. S obzirom na broj cinkovih iona, konfiguraciju aktivnog mjesta i primarnu strukturu, metalo-beta-laktamaze dijele se na podgrupe B1, B2 i B3 (61). Iako dijele sličan mehanizam, klase A, C i D beta-laktamaza karakterizira velika strukturna raznolikost (59).

Funkcionalna klasifikacija puno je preciznija jer u obzir uzima funkcionalne parametre enzima, no klasifikacija po Ambleru se puno češće koristi zbog svoje jednostavnosti, te će se zbog toga koristiti i u ovom radu. Karbapenemaze su prema funkcionalnoj klasifikaciji razvrstane u 3 funkcionalne skupine, odnosno 3 Amblerove klase. Klasifikacija klinički najznačajnijih karbapenemaza i njihov spektar hidrolize beta-laktamskih antibiotika prikazani su na slici 4.



**Slika 4.** Hidrolitički spektar karbapenemaza iz Amblerovih klasa A, B i D.

### 1.5.1. KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE A

Serinske karbapenemaze klase A spadaju u funkcionalnu skupinu 2f. Iako su otkrivene početkom osamdesetih godina, njihova pojavnost u enterobakterijama sve do kraja 1990-ih godina ima sporadičan karakter (36). U navedenom periodu, spomenute se karbapenemaze uglavnom detektiraju u enterobakteriji *E. cloacae*, *S. marcescens* i *Klebsiella* spp. u sklopu vrlo ograničenih epidemija ili pojedinačnih slučajeva. Najznačajniji predstavnici ove klase su KPC, GES, NMC, IMI i SME. Geni *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>GES</sub> lokalizirani su na plazmidima, dok geni koji kodiraju NMC, IMI i SME leže na bakterijskom kromosomu (24). Sve karbapenemaze klase A hidroliziraju širok spektar beta-laktama, poglavito peniciline,



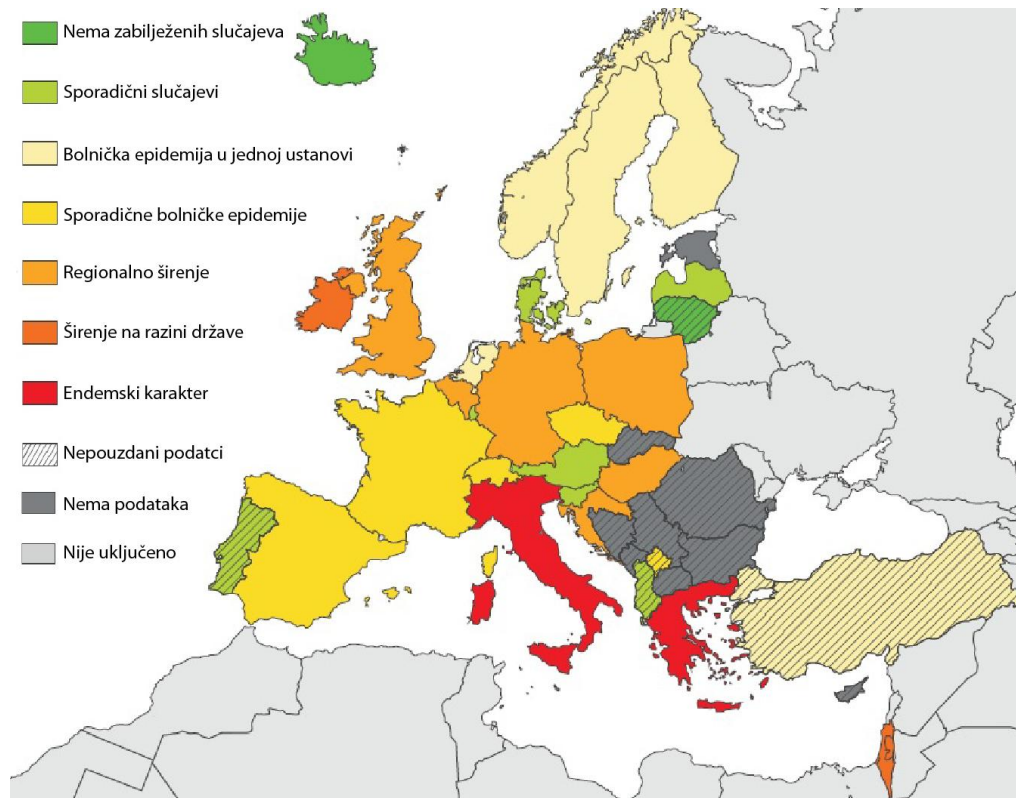
aztreonam i karbapeneme. U većoj ili manjoj mjeri njihovu hidrolitičku aktivnost inhibiraju klavulanska kiselina i tazobaktam zbog čega su smještene u funkcionalnu skupinu 2f (24, 36).

Smatra se da nastanak karbapenemaza iz klase A nije direktna posljedica kliničke primjene karbapenema, već da je ona samo okidač koji je omogućio njihovo daljnje širenje. Prvi izolat *S. marcescens* koji je proizvodio SME-1 opisan je 1982. godine, 3 godine prije uvođenja imipenema, prvog karbapenema, u kliničku praksu. Smatra se da ovi enzimi bilježe svoju prisutnost u bakterijama iz vremena davno prije kliničke upotrebe karbapenema, te da su se javili kao odgovor na prirodne varijante karbapenema koje sintetiziraju neke bakterije tla. Primjer takve bakterije je *Streptomyces cattleya* koja prirodno sintetizira tienamicin čiji je derivat upravo imipenem (54, 62).

#### 1.5.1.1. PLAZMIDNE KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASA A

Beta-laktamaze KPC su trenutno klinički najznačajnije karbapenemaze iz Amblerove klase A (54). KPC karbapenemaze hidroliziraju sve klase beta-laktamskih antibiotika, no s najvećom efikasnošću hidroliziraju nitrocefim, cefalotin, cefaloridin, benzilpenicilin, ampicilin i piperacilin. Hidrolitička aktivnost spram imipenema, meropenema, cefotaksima i aztreonama je 10 puta manja u usporedbi s penicilinima i cefalosporinima prve generacije (24). Hidroliza cefoksitina i ceftazidima je slaba, no detektabilna. Inhibicija ovog enzima klavulanskom kiselinom i tazobaktamom slabije je izražena za razliku od ostalih karbapenemaza iz ove skupine (36). Karbapenemaza KPC prvi puta je opisana 1996. godine u SAD-u, u izolata *K. pneumoniae*, nakon čega je uslijedilo njihovo globalno širenje (25). Do sada su opisane 24 varijante ovog enzima (36). Dvije najznačajnije varijante su KPC-2 i KPC-3 koje se međusobno razlikuju u samo jednom aminokiselinskom ostatku. Prisutnost gena *bla<sub>KPC</sub>* uglavnom se opisuje u izolata vrste *K. pneumoniae*, no njegova prisutnost zamijećena je i u *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens* i *Enterobacter* spp. (36). Od svih karbapenemaza iz Amblerove klase A, odnosno funkcionalne skupine 2f, karbapenemaze KPC ima najveći potencijal širenja zbog plazmidne lokaliziranosti gena *bla<sub>KPC</sub>* i činjenice da se uglavnom povezuje s vrstom *K. pneumoniae* koja je poznata po tome što s lakoćom, horizontalnim prijenosom, akumulira širok spektar gena rezistencije, no ujedno ih vrlo lako širi (24). Uz rezistenciju na beta-laktamske antibiotike, plazmidi koji nose gene *bla<sub>KPC</sub>* često nose gene za rezistenciju na kinolone, aminoglikozide, tetracikline, trimetoprim i sulfonamide zbog čega su KPC izolati često višestruko rezistentni ili čak pan rezistentni (36). Izazov ujedno predstavlja širenje visoko rizičnim epidemijskim klonom ST258 (36, 54). Iako je ST258 dominantan

klon, prisutnost gena *bla*<sub>KPC</sub> opisana je i u ostalim klonovima vrste *K. pneumoniae* (36). Izvan Europe, prisutnost KPC-producirajućih enterobakterija poprimila je endemski karakter u nekim državama SAD-a, Kolumbiji, Argentini, a česta pojavnost bilježi se u Meksiku i Portoriku (36). Doseg širenja enterobakterija koje proizvode KPC u Aziji nije u potpunosti poznat, no zna se da su neke regije Kine postale endemične. S druge strane opisi KPC izolata iz Indije su vrlo rijetki (54). Izrael je također prepoznat kao endemska država u kojoj se često opisuju bolničke infekcije, no poznato je i nekoliko slučajeva u kojima je dokazan izvanbolnički prijenos. U Europi, izvješća o izolatima u kojih je detektiran gen *bla*<sub>KPC</sub> dolaze odasvud, no uglavnom su povezani s uvozom iz endemskih država. Europske zemlje u kojima je prisutnost enterobakterija koje proizvode KPC poprimila endemski karakter su Grčka i Italija (54) (Slika 5.).



**Slika 5.** Pojavnost KPC-producirajućih enterobakterija na području Europe do veljače 2013. Slika preuzeta iz studije Glasner i suradnika iz 2013. godine (63), uz preinake.

Beta-laktamaze iz porodice GES/IBC su karbapenemaze niske prevalencije koje se sporadično opisuju otkako je 2000. godine IBC-1 opisana u jednom izolatu *E. cloacae* u Grčkoj. Nedugo potom, opisana je GES-1 u izolatu *K. pneumoniae* u Francuskoj Gvajani (24). Ova dva enzima razlikovala su se u samo dva aminokiselinska ostatka, a s obzirom da im je hidrolitički spektar obuhvaćao peniciline i cefalosporine proširenog spektra prvotno su klasificirani kao ESBL enzimi. Već 2001. godine opisana je GES-2 varijanta čiji je hidrolitički spektar obuhvaćao i imipenem (24). S vremenom je nomenklatura karbapenemaza iz GES/IBC porodice prošla kroz reviziju i sve su varijante IBC beta-laktamaza preimenovane u GES. Do sada je opisano 27 varijanti beta-laktamaza GES, od čega GES-2, -4, -5, -6, -11, -14 i -18 imaju karbapenemaznu aktivnost. Nekoliko je varijanti ovog enzima identificirano u Gram-negativnih bakterija, od čega su GES-4, -5 i -6 detektirane u enterobakterija (36). Iako je prevalencija beta-laktamaza GES vrlo niska, sporadični slučajevi opisani su u Grčkoj, Francuskoj, Portugalu, Južnoafričkoj Republici, Francuskoj Gvajani, Brazilu, Argentini, Južnoj Koreji i Japanu (24).

#### 1.5.1.2. KROMOSOMSKE KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASE A

Izolate koji proizvode kromosomske karbapenemaze SME, NMC i IMI karakterizira specifičan profil rezistencije koji obuhvaća karbapeneme, no svi su osjetljivi na cefalosporine proširenog spektra (24). SME-1 je prvi puta opisana 1982. godine u dva izolata *S. marcescens* u Engleskoj, a njezine varijante, SME-2 i SME-3 opisane su u zemljama Sjeverne Amerike (24). IMI karbapenemaze su prvi puta opisane u SAD-u 1996. godine u izolata *E. cloacae*. Plazmidna varijanta IMI-2 je uskoro pronađena u vrsti *E. cloacae* u Kini, te u izolata *Enterobacter asburiae* prikupljenih iz uzoraka riječnih voda diljem SAD-a. Pojavnost karbapenemaza IMI je vrlo niska i do sada je opisano 11 varijanti ovog enzima, uglavnom u vrsta *Enterobacter* spp. i u jednom slučaju *E. coli*. Širenje ove karbapenemaze ograničeno je, a enterobakterije s genom *bla<sub>IMI</sub>* identificirane su u Sjevernoj Americi, Argentini, Francuskoj, Španjolskoj, Finskoj, Hrvatskoj i Irskoj (36, 54). NMC-A prvi je puta opisana u izolata *E. cloacae*, u Francuskoj 1990. godine. Ovaj se enzim razlikuje od IMI-1 i IMI-2 u samo 8 aminokiselinskih ostataka (62). NMC-A i IMI dijele visok stupanj sličnosti (97%), dok sa SME-1 dijele 70% sličnosti (24).

### 1.5.2. KARBAPENEMAZE AMBLEROVE KLASSE B

Karbapenemaze Amblerove klase B, poznatije kao metalo-beta-laktamaze, hidroliziraju širok spektar beta-laktamskih antibiotika koji uključuje sve peniciline i cefalosporine, te karbapeneme. Ne inhibiraju ih klasični inhibitori beta-laktamaza poput klavulanske kiseline, no inhibira ih aztreonam (24, 61). S obzirom da su česte u višestruko rezistentnih bakterija koje proizvode i ESBL, inhibitorni učinak aztreonama često izostaje (36). Okosnicu mehanizma kojim metalo-beta-laktamaze hidroliziraju beta-laktamske antibiotike, po čemu su i dobile ime, čine atomi cinka koji se nalaze u aktivnom mjestu ovih enzima. S obzirom da su atomi cinka u aktivnom mjestu nužan preduvjet njihovog katalitičkog djelovanja, zajednička karakteristika svih metalo-beta laktamaza je da ih inhibira EDTA i ostali kelatori divalentnih metalnih kationa (61). Sve metalo-beta laktamaze hidroliziraju imipenem, no uz varijabilnu efikasnost, što ih svrstava u funkcionalnu skupinu 3 (61). Strukturno gledajući, metalo-beta-laktamaze su vrlo raznolika skupina enzima što uvelike otežava njihovu klasifikaciju unutar Amblerove klase B. Beta-laktamaze klase B podijeljene su u 3 podskupine. U predstavnike podskupine B1 spadaju sve klinički relevantne metalo-beta-laktamaze poput VIM, IMP i NDM i zajednička karakteristika im je da im je atom cinka u aktivnom mjestu koordiniran s tri histidina i jednim cisteinom. Podskupine B2 i B3 čine strukturno nešto drugačiji enzimi manje kliničke značajnosti (61).

Prvotno opisane metalo-beta-laktamaze bile su kromosomski kodirane beta-laktamaze koje su otkrivene u bakterija poput *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas* spp. koje prirodno čine mikrobiotu tla i ostalih prirodnih staništa (24, 61). Smatra se da je nastanak kromosomskih metalo-beta-laktamaza u tim bakterijama posljedica prirodne izloženosti beta-laktamima koje sintetiziraju različiti mikroorganizmi, no postoji i mogućnost da ovi enzimi imaju i druge funkcije u staničnim procesima koji još nisu dovoljno istraženi. U velikom broju slučajeva, ekspresija kromosomski kodiranih metalo-beta-laktamaza je inducibilna, a bakterije koje ih proizvode karakterizira velik stupanj rezistencije na beta-laktamske antibiotike. Srećom, uglavnom se radi o bakterijama zanemarive kliničke važnosti koje izazivaju oportunističke infekcije, izuzev *S. maltophilia* i *Bacillus anthracis* (61).

Za razliku od kromosomski kodiranih metalo-beta-laktamaza čija je pojavnost direktno korelirana s prevalencijom bakterija koje ih proizvode, od većeg su epidemiološkog značaja metalo-beta-laktamaze čiji geni počivaju na plazmidima. Najznačajnije metalo-beta-laktamaze koje spadaju u ovu skupinu su VIM, IMP i NDM, te u manjoj mjeri SPM, GIM i SIM. Geni koji kodiraju ove enzime često se nalaze unutar integrona koji su zaslužni za

njihovu mobilizaciju i ugradnju u plazmide i transpozone čime se značajno olakšava njihov horizontalni prijenos (24, 36, 61). Karbapenemaze SPM, GIM i SIM se uglavnom povezuju s vrstama *P. aeruginosa* i *A. baumannii* zbog čega će se u narednom dijelu detaljniji opis predstavnika ove skupine metalo-beta-laktamaza koncentrirati na VIM, IMP i NDM (24).

#### 1.5.2.1. IMP (eng. „active on imipenem“)

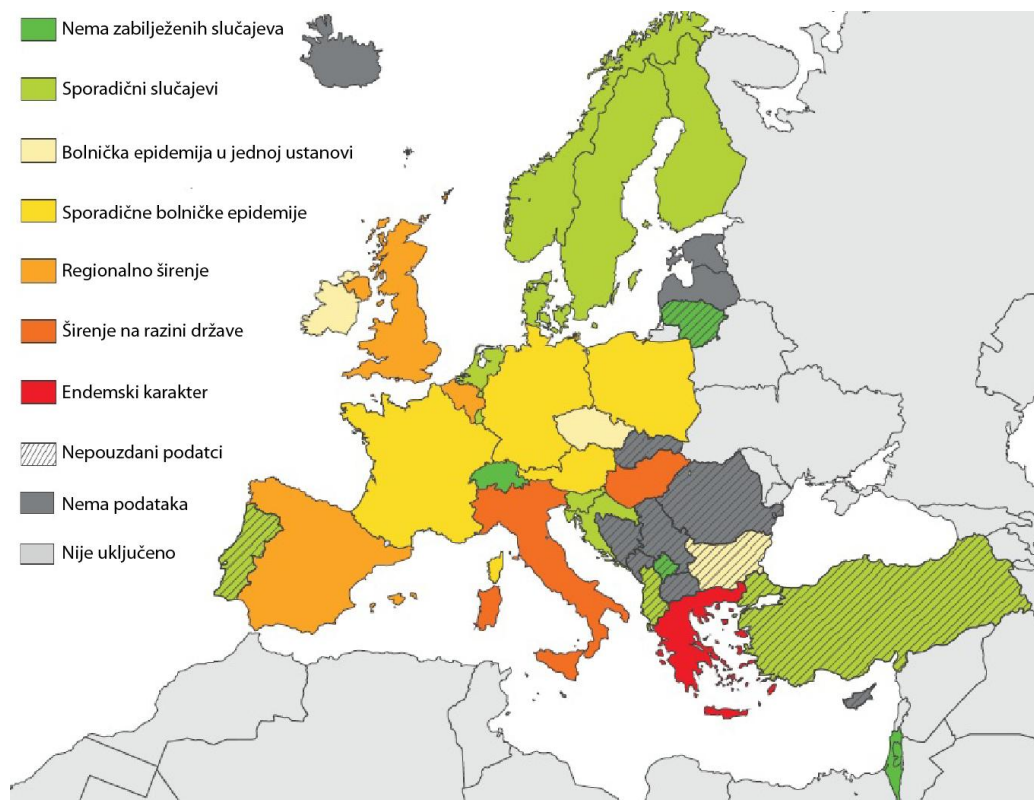
IMP je prva plazmidna karbapenemaza koja je opisana u znanstvenoj literaturi. Opisana je 1988. godine u jednom izolatu *P. aeruginosa*, a ime je dobila jer efikasno hidrolizira imipenem (24). Već 1993. godine opisana je u izolatu *S. marcescens*, nakon čega se širi diljem Japana i svijeta. Za razliku od ostalih karbapenemaza, prevalencija enterobakterija koje proizvode karbapenemazu IMP je vrlo mala i uglavnom se veže uz pojedinačne slučajeve ili vrlo ograničene bolničke epidemije. Najveća prevalencija enterobakterija koje proizvode IMP i dalje je u zemljama dalekog istoka s time da je njihova prisutnost u Japanu i Tajvanu zadržala endemski karakter (36). Do sada je opisano više od 50 varijanti ovog enzima, a svima je zajedničko da hidroliziraju peniciline, cefalosporine i karbapeneme, no ne hidroliziraju aztreonam (24). Geni *bla<sub>IMP</sub>* se uglavnom dovode u vezu s integronima klase 1 zbog čega se često vezano nasljeđuju s genima za rezistenciju na aminoglikozide, sulfonamide i kloramfenikol (36). Plazmidi koji nose gen *bla<sub>IMP</sub>* često su raznoliki i spadaju u širok spektar različitih skupina inkompatibilnosti (36).

#### 1.5.2.2. VIM (eng. „Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase“)

Metallo-beta-laktamaza VIM-1 po prvi je put opisana 1997. godine u Italiji, odnosno Veroni, u izolatu *P. aeruginosa*. Uskoro je slijedio opis VIM-2 varijante ovog enzima koja je identificirana također u izolatu *P. aeruginosa* prikupljenom u Francuskoj 1996. godine (24). Do sada je opisano više od 40 varijanti karbapenemaze VIM, proizvodnja se uglavnom povezuje s *P. aeruginosa*, no posljednjih godina raširenost *bla<sub>VIM</sub>* među enterobakterijama značajno raste (24). Kao i sve ostale metalo-beta-laktamaze, karbapenemaze VIM hidroliziraju širok spektar beta-laktamskih antibiotika, ne hidroliziraju aztreonam i podložne su inhibiciji s EDTA (61). Geni koji kodiraju karbapenemazu VIM uglavnom su lokalizirani unutar genskih kazeta integrona klase 1 koji se često nalaze u sklopu transpozona. Struktura integrona *bla<sub>VIM</sub>* je varijabilna i do danas je opisano više od 100 različitih varijanti što je posljedica velike mobilnosti gena *bla<sub>VIM</sub>* i čestih genskih preslagivanja (36). S obzirom da se

nalaze unutar genskih kazeta integrona također se vezano nasljeđuju s genima za rezistenciju na ostale klase antibiotika, poput aminoglikozida, kloramfenikola, tetraciklina, sulfonamida i trimetoprima.

Izolati enterobakterija koji proizvode karbapenemazu VIM opisani su širom svijeta, što i ne iznenađuje s obzirom da je karbapenemaza VIM trenutno najraširenija plazmidna metalo-beta-laktamaza (24). Širenje vrsta *K. pneumoniae* i *E. coli* koje proizvode karbapenemazu VIM često je poliklonskog karaktera i veže se uz horizontalni prijenos gena *bla<sub>VIM</sub>* (36). Izolati enterobakterija u kojima su detektirani geni *bla<sub>VIM</sub>* često se opisuju širom Europe, Afrike, Azije te Sjeverne i Južne Amerike u sklopu pojedinačnih slučajeva ili bolničkih epidemija širih razmjera. U Europi se povećana prevalencija VIM izolata enterobakterija bilježi na području Sredozemlja, gdje se opet ističu Grčka i Italija kao endemske zemlje (36, 54). Velik broj znanstvenih radova koji se bave problematikom širenja rezistencije na karbapeneme u Grčkoj opisuju obimno širenje VIM-1 *K. pneumoniae* na nacionalnoj razini, uz čestu pojavnost ove varijante enzima u *E. coli*, *C. freundii*, *M. morgani*, *K. oxytoca* i *Serratia* spp. (54) (Slika 6.).



**Slika 6.** Pojavnost VIM-producirajućih enterobakterija na području Europe do veljače 2013. Slika preuzeta iz studije Glasner i suradnika iz 2013. godine (63), uz preinake.

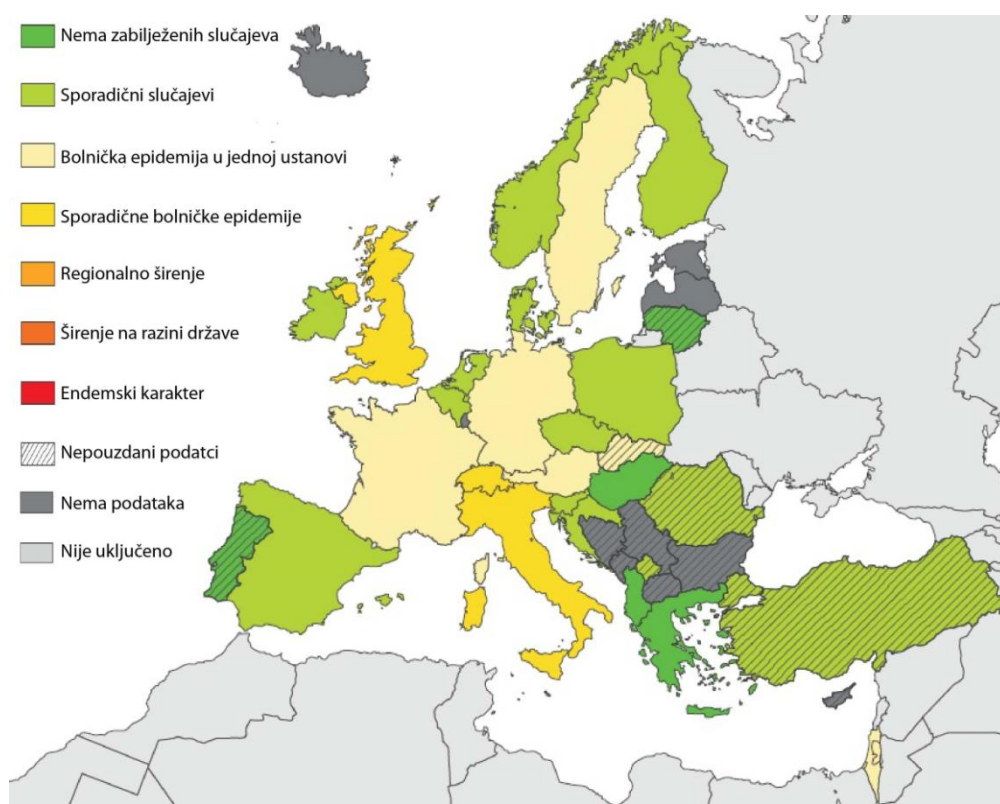
### 1.5.2.3. NDM (eng. „New Delhi metallo-beta-lactamase“)

Metallo-beta-laktamaza NDM prvi je puta opisana u Švedskoj 2008. godine, u izolata *K. pneumoniae* iz pacijenta indijskog porijekla koji je prethodno bio hospitaliziran u bolnici u New Delhiju (64). Ubrzo nakon opisa prvog slučaja, širenje enterobakterija koje proizvode ovu karbapenemazu uzela je maha i uslijedili su opisi iz velikog broja drugih zemalja. Do sada je opisano 17 varijanti ovog enzima, od čega većina potječe iz Azije (54).

NDM-1 je jedna od klinički najznačajnijih metallo-beta-laktamaza i karbapenemaza općenito. Vrlo efikasno hidrolizira širok spektar beta-laktamskih antibiotika, od čega najveći afinitet pokazuje prema penicilinima, svim cefalosporinima i karbapenemima. Kao i sve ostale metallo-beta-laktamaze ne hidrolizira monobaktame poput aztreonama (64). Geni *bla<sub>NDM</sub>* često se detektiraju u višestruko rezistentnim izolatima koji na istom ili različitim plazmidima nose gene za rezistenciju na aminoglikozide, kinolone, makrolide, rifampicin, kloramfenikol, sulfonamide i trimetoprim (54). Geni *bla<sub>NDM</sub>* nerijetko se detektiraju u izolatima enterobakterija koji koproduciraju plazmidne beta-laktamaze AmpC i karbapenemaze poput OXA-48, KPC i VIM (36).

Enterobakterije koje proizvode karbapenemazu NDM globalno su raširene i opisane su na svim naseljenim kontinentima. S obzirom da je Indijski potkontinent primarni rezervoar NDM-producirajućih enterobakterija, prevalencija NDM izolata najveća je na području Indije i Pakistana. NDM-producirajuće bakterije sveprisutne su na Indijskom potkontinentu, a gen *bla<sub>NDM</sub>* je raširen u bakterijama prirodne mikrobiote tla i površinskih voda (54). Značajno širenje NDM-producirajućih enterobakterija zabilježeno je u Ujedinjenom Kraljevstvu što je posljedica socio-ekonomskih migracija s Indijskog potkontinenta. Uz ujedinjeno Kraljevstvo, Francuska također bilježi intenzivno širenje, no NDM-1-producirajuće enterobakterije opisuju se i u ostalim europskim zemljama (64). Pojavnost NDM-producirajućih enterobakterija na području Europe u vremenskom okviru ovog istraživanja prikazana je na slici 7. Kao sekundarni rezervoari NDM-producirajućih enterobakterija spominju se područje Balkana, Arapski poluotok i zemlje Sjeverne Afrike. Međunarodna putovanja jedan su od glavnih pokretača širenja NDM-1 producirajućih enterobakterija, a velika prevalencija zabilježena je uglavnom u državama u kojima žive velike zajednice Indijaca i Pakistanaca, pa je uz već spomenuto Ujedinjeno Kraljevstvo, velika pojavnost zabilježena u Kanadi, Sjedinjenim Američkim Državama, Irskoj, Južnoafričkoj Republici, Saudijskoj Arabiji i Australiji (54, 64).

Iako je gen  $bla_{NDM-1}$  do sada opisan u velikom broju vrsta enterobakterija, *K. pneumoniae* i *E. coli* su najodgovornije za izazivanje bolničkih i izvanbolničkih infekcija. Povezanost gena  $bla_{NDM-1}$  s vrstom *E. coli* priličan je razlog za brigu s obzirom na to da je ta vrsta prepoznata kao najčešći uzročnik infekcija mokraćnog sustava i diareje. Širenje dijareom u kombinaciji s prenapučenošću i lošim higijenskim uvjetima glavni su čimbenici odgovorni za veliku prevalenciju NDM-producirajućih bakterija u Jugoistočnoj Aziji (54). Na primjeru širenja višestruko rezistentne *E. coli* koja proizvodi beta-laktamazu CTX-M proširenog spektra može se ustvrditi da prevencija širenja rezistencije u izvanbolničkom okruženju nema blistavu budućnost.



**Slika 7.** Pojavnost NDM-producirajućih enterobakterija na području Europe do veljače 2013. Slika preuzeta iz studije Glasner i suradnika iz 2013. godine (63), uz preinake.



### 1.5.3. KARBAPENEM-HIDROLIZIRAJUĆE BETA-LAKTAMAZE AMBLEROVE KLASE D

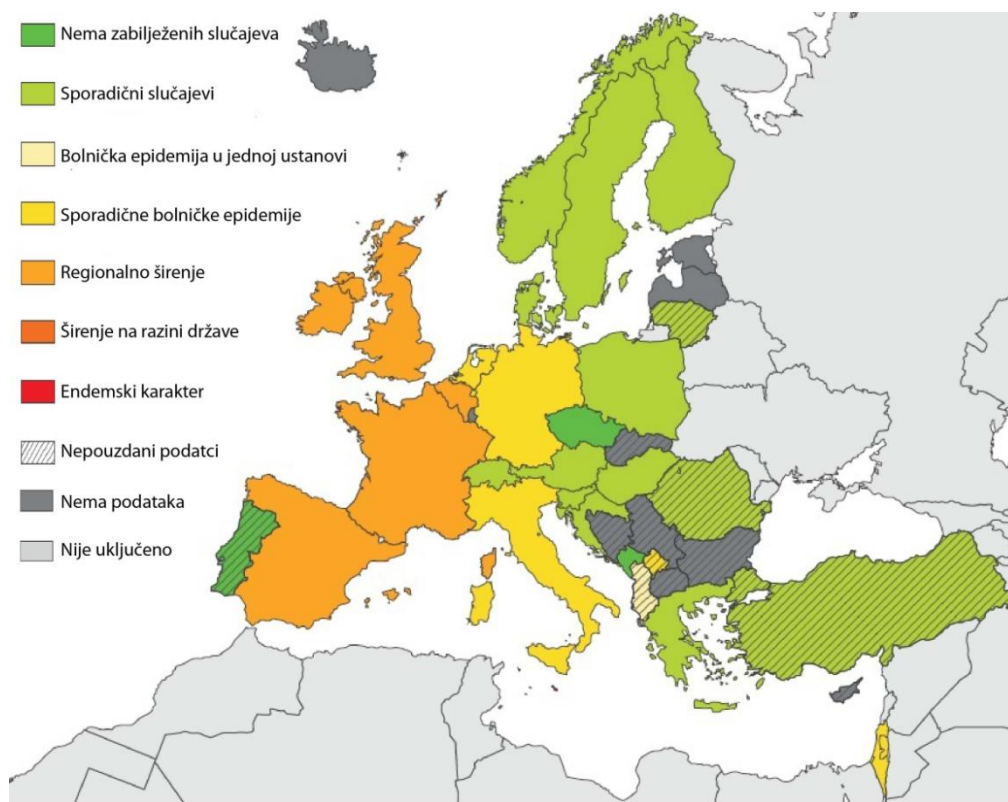
U Karbapenemaze iz Amblerove klase D uglavnom spadaju beta-laktamaze OXA (eng. „oxacillinase). Beta-laktamaze OXA su skupina koju čini više od 400 različitih varijanti enzima šarolike hidrolitičke aktivnosti (54). Neke varijante su beta-laktamaze uskog spektra, neke posjeduju ESBL karakteristike, a samo manji udio ovih enzima ispoljava karbapenemaznu aktivnost (36). Karbapenemaze OXA se često u literaturi spominju pod zajedničkim terminom „Carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases“ – CHDL (65). Svi CHDL enzimi pokazuju slabu karbapenemaznu aktivnost, pa se izražena rezistencija na karbapeneme uglavnom ispoljava u izolata koje karakterizira smanjena propusnost prouzrokovana gubitkom porina (54). Uz slabu karbapenemaznu aktivnost, CHDL enzimi uglavnom ne hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra, no izuzetno dobro hidroliziraju temocilin (36, 54). Ne inhibiraju ih klavulanska kiselina, tazobaktam i sulbaktam, no inhibicija s NaCl se često uočava u uvjetima *in vitro* (65). Iako je većina CHDL enzima detektirana u bakterijskih vrsta roda *Acinetobacter*, OXA-48 i njezini derivati uglavnom se povezuju s enterobakterijama (54).

Karbapenemaza OXA-48 prvi je puta opisana 2003. godine u Turskoj, u izolatu *K. pneumoniae* iz 2001. godine (65). U početku je širenje enterobakterija s genom *bla*<sub>OXA-48</sub> bilo ograničeno na Tursku, Bliski Istok i Sjevernu Afriku, te se i danas to područje smatra primarnim rezervoarom (30). Od 2007. godine opisuju se prvi slučajevi u Europi koji su se vrlo vjerojatno javili kao posljedica intenzivnih migracija iz navedenih endemskih područja (Slika 8.) (36).

Lokalizacija gena koji kodira karbapenemazu OXA-48 često se opisuje na izrazito konjugativnom plazmidu veličine 62 kb koji spada u skupinu inkompatibilnosti IncL/M (36). Ovaj plazmid je specifičan i po tome, što uz gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, ne nosi druge gene za rezistenciju (30). Od otkrića OXA-48 opisano je još nekoliko varijanti ovog enzima, od čega su najznačajnije OXA-162, -163, -181, -204, -232, -244 i -245 koji se od OXA-48 razlikuju u samo nekoliko aminokiselinskih ostataka (36).

Značajno širenje OXA-48-producirajućih enterobakterija na području Europe zabilježeno je u Španjolskoj, Francuskoj, Njemačkoj, Švicarskoj, Nizozemskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu, no valja napomenuti da je cijelo područje Sredozemlja zahvaćeno širenjem (30, 36). Za razliku od Europe, u Indiji je OXA-181 varijanta identificirana kao dominantna karbapenemaza iz skupine koju čine OXA-48 „nalik“ enzimi. S druge strane, Rusija, Kina,

Australija te zemlje Sjeverne i Južne Amerike bilježe vrlo nisku prevalenciju enterobakterija u kojima je detektirana karbapenemaza OXA-48 (38).



**Slika 8.** Pojavnost OXA-48-producirajućih enterobakterija na području Europe do veljače 2013. Slika preuzeta iz studije Glasner i suradnika iz 2013. godine (63), uz preinake.

## **1.6. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA KARBAPENEME**

Enterobakterije smanjene osjetljivosti na karbapeneme uzrokuju širok spektar infekcija koje se uglavnom otežano ili neuspješno liječe što često rezultira produljenjem hospitalizacije i povećanom stopom smrtnosti (12). Rana identifikacija ovakvih uzročnika vrlo je važna zbog odabira terapije, pogotovo u pacijenata hospitaliziranim u jedinicama intenzivne njege, te zbog pravovremene uspostave mjera sprečavanja daljnjeg širenja (66). Utvrđivanje profila rezistencije kliničkih izolata prvi je korak u identifikaciji mehanizama rezistencije na karbapeneme. (4) Metode koje se najčešće koriste za određivanje antibiograma su disk difuzijski test po Kirby-Baueru, mikrodilucija, epsilometarski test (E-test), te komercijalni automatizirani sustavi (66). Povišena MIK vrijednost ili smanjena zona inhibicije karbapenema i bar jednog cefalosporina treće generacije osnovni je kriterij prema kojem se izolat mora podvrgnuti daljnjem testiranju fenotipskim i molekularno-biološkim metodama (58). Prema naputcima EUCAST-a (eng. „European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing“) izolati enterobakterija prikazuju smanjenu osjetljivost na imipenem i meropenem kad je njihov MIK veći od 2 mg/L, odnosno ako je promjer zone inhibicije oko diska manji od 22 milimetra. U slučaju ertapenema smanjena se osjetljivost definira pri MIK vrijednostima većim od 0,5 mg/L, odnosno ako je promjer zone inhibicije manji od 25 milimetara (67).

Fenotipska detekcija proizvodnje karbapenemaza i detekcija gena koji kodiraju karbapenemaze nužni su s obzirom da se proizvodnja karbapenemaza u kliničkim izolatima ne može se detektirati isključivo na temelju antibiograma (58). Potrebno je naglasiti da rezistencija na karbapeneme često varira u izolata koji proizvode karbapenemaze, zbog čega se, na temelju MIK vrijednosti i inhibicijskih zona testiranih karbapenema, analizirani izolat može okarakterizirati kao osjetljiv (58, 68). Zbog navedenog, određena frakcija izolata enterobakterija neminovno prolazi nedetektirana unatoč činjenici da su i EUCAST i CLSI (eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“) značajno postrožili kriterije interpretacije rezistencije. Navedene organizacije ustraju na tome da se osjetljivi izolati koji proizvode karbapenemaze, u terapijskom pogledu i dalje interpretiraju kao osjetljivi, a da se detekcija i identifikacija karbapenemaza vrše samo u svrhu radnji vezanih uz kontrolu širenja i epidemioloških analiza (4, 70).

Do sada je opisan veliki broj „in-house“ i komercijalnih fenotipskih testova koji se primjenjuju u svrhu detekcije i identifikacije karbapenemaza. Iako većinu takvih testova karakterizira visoka osjetljivost i specifičnost, niti jedan nema apsolutnu diskriminatornu moć

(66). Većina fenotipskih metoda koje se danas primjenjuju baziraju se ne primjeni inhibitora beta-laktamaza poput EDTA, fenil-boronične kiseline, dipikolinčne kiseline ili 2-merkaptopropionske kiseline (58). Testovi koji se baziraju na inhibiciji uspješno se koriste u detekciji i identifikaciji karbapenemaza iz klase A i B, no ne primjenjuju se za karbapenemaze klase D, poput OXA-48. Inhibicijski testovi se uglavnom koriste u formatu kombiniranih diskova s meropenemom (eng. "combination disk test", CD) ili kao test sinergizma dva diska (eng. "Double Disk Synergy Test", DDST). U identifikaciji karbapenemaza Amblerove klase A, poglavito KPC enzima, koriste se inhibicijski testovi koji se baziraju na boroničnoj ili fenil-boroničnoj kiselini s obzirom da su ti spojevi efikasni inhibitori serinskih beta-laktamaza, izuzev beta-laktamaza klase D. U slučaju metalo-beta-laktamaza koriste se inhibitori metalo-enzima poput EDTA, dipikolinične kiseline i 2-merkaptopropionske kiseline. Zbog jednostavnosti i lake dostupnosti uglavnom se koriste testovi koji se baziraju na EDTA koja, kao kelator divalentnih metalnih kationa, inhibira djelovanje karbapenemaza klase B. Iako su testovi s EDTA prilično osjetljivi i specifični, u obzir treba uzeti i njenu baktericidnu aktivnost i sposobnost da povećava permeabilnost staničnih membrana, što ponekad rezultira lažnom pozitivnošću (4, 58, 66)

Molekularno-biološki testovi poput lančane reakcije polimerazom (eng. „polymerase chain reaction“, PCR) koriste se kako bi se, na temelju dobivenih fenotipskih analiza, potvrdila prisutnost gena koji kodiraju karbapenemaze. PCR se koristi kao „zlatni standard“ u detekciji i identifikaciji karbapenemaza zbog visoke specifičnosti i osjetljivosti. Financijski troškovi i stručnosti laboratorijskog osoblja razlog su zašto se ova metoda koristi uglavnom u referentnim centrima. Nedostatak PCR-a leži u činjenici da može detektirati samo poznate karbapenemaze (ili njihove varijante), no ne može se koristiti u detekciji i identifikaciji karbapenemaza koje nisu opisane i kojima se ne zna primarna DNA struktura (66, 69).

Uz navedene testove sve se više počinju primjenjivati biokemijski testovi poput CarbaNP koji vrlo brzo i jednostavno detektiraju prisutnost karbapenemaza. Uporaba testova koji se baziraju na spektrofotometriji i masenoj spektroskopiji sve je učestalija, no navedene metode nadilaze opseg ovog rada, pa se neće podrobnije opisivati (66).

## 1.7. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA U ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME

Višestruka rezistencija zajednička je karakteristika enterobakterija rezistentnih na karbapeneme neovisno o mehanizmu koji stoji u pozadini rezistencije i uvelike sužava terapijski izbor antibiotika prilikom liječenja infekcija uzrokovanih ovakvim uzročnicima (24, 70). Plazmidna lokalizacija gena koji kodiraju karbapenemaze i ESBL enzime jedan je od glavnih razloga pojave višestruko rezistentnog fenotipa. Geni koji kodiraju karbapenemaze uglavnom se nalaze na plazmidima koji nose gene za rezistenciju na ostale klase antibiotika, poglavito aminoglikozide, sulfonamide, trimetoprim, kloramfenikol, tetracikline i kinolone (36). Uz navedeno, geni koji kodiraju karbapenemaze često se nalaze u sklopu genskih kazeta integrona koji su kao mobilni genetički elementi direktno ili indirektno odgovorni za mobilizaciju gena rezistencije i njihovu ugradnju u plazmide (70, 71). Posljedica toga je vezano nasljeđivanje gena koji kodiraju karbapenemaze sa šarolikim spektrom gena rezistencije za aminoglikozide i sulfonamide (36, 72, 73). Izolati enterobakterija rezistentnih na karbapeneme često posjeduju više različitih plazmida koji također nose gene rezistencije, pa lokalizacija gena za rezistenciju *in cis* nije jedini razlog ispoljavanja ovakvog fenotipa (9). S obzirom da genski kontekst gena *bla<sub>ESBL</sub>*, poglavito *bla<sub>CTX-M</sub>*, karakterizira istovjetna genska okolina na pokretnim genetičkim elementima, izolati enterobakterija koji su rezistentni na karbapeneme, a ne proizvode karbapenemaze, u ovom pogledu posjeduju zajedničke karakteristike (74).

Višestruka rezistencija u enterobakterija definira se kao neosjetljivost na barem jedan antibiotik iz minimalno 3 različite klase antibiotika. Ukoliko je bakterijska vrsta intrinzički rezistentna na određeni antibiotik ili klasu antibiotika, ta se klasa ne uzima u obzir pri definiranju višestruko rezistentnog fenotipa (75, 76). S obzirom da prema navedenim kriterijima karbapenemaze i ESBL enzimi hidroliziraju širok spektar različitih klasa beta-laktamskih antibiotika, izolati enterobakterija koji posjeduju ove gene za rezistenciju uglavnom spadaju u višestruko rezistentnu kategoriju sami po sebi.

Najznačajniji mehanizam rezistencije na aminoglikozide u višestruko rezistentnih enterobakterija je modifikacija aminoglikozida plazmidnim aminoglikozid-modificirajućim enzimima (77). S obzirom na mehanizam djelovanja, ovi se enzimi dijele na aminoglikozid acetiltransferaze (AAC), aminoglikozid fosfotransferaze (APH) i aminoglikozid nuklotidiltransferaze (ANT). Navedeni su enzimi sveprisutni među enterobakterijama i odgovorni su na rezistenciju na gentamicin i amikacin, aminoglikozide koji se najčešće koriste u kliničkoj praksi. Najznačajniji i najrašireniji aminoglikozid modificirajući enzimi u

enterobakterija su AAC(6')-Ib, AAC(3')-II, aadA1, APH(3')-Ia i ANT(2') (78). Uz modifikaciju aminoglikozida, sve se češće opisuje prisutnost plazmidnih ribosomskih metilaza koje se uglavnom povezuju s NDM-1 izolatima enterobakterija u Istočnoj Aziji (79). Ribosomske metilaze modificiraju ribosomsku RNA što za posljedicu ima pojavu iznimne rezistencije na aminoglikozide. Najznačajnije ribosomske metilaze su : rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, armA i npmA (80).

Rezistencija na sulfonamide uglavnom se ispoljava kroz mehanizam u koji su uključeni geni *sulI*, *sulII* i *sulIII*. To su plazmidne varijante dihidropteroat sintaze, koje za razliku od kromosomski kodiranih varijanti nisu podložne djelovanju sulfonamida. Mehanizam rezistencije na trimetoprim bazira se na istom principu kao i rezistencija na sulfonamide. Temelj rezistencije čine mutirane forme enzima čiji se geni nalaze na plazmidima koji komplementiraju postojeći enzim (47). Za razliku od rezistencije na sulfonamide, postoji više od 30 varijanti ovog enzima. Najučestaliji varijanta enzima dihidrofolat reduktaze koja uzrokuje rezistentnost kod enterobakterija je *dfrI*. Geni rezistencije na sulfonamide i trimetoprim često se nalaze u sklopu genskih kazeta integrona i široko su rasprostranjeni među enterobakterijama (47, 71).

Većina gena koji doprinose rezistenciji bakterija na tetracikline prenosi se plazmidima i transpozonomima. Trenutno je opisano 35 različitih gena koji su odgovorni za rezistenciju na tetracikline (geni *tet*) i 3 koji su odgovorni za rezistenciju na oksitetracikline (*otr*). Od 35 gena *tet*, 23 gena kodira efluks pumpe, 11 gena kodira proteine koji štite ribosome od tetraciklina, a 1 gen (*tet U*) ima nepoznati mehanizam djelovanja (81). Najučestaliji geni *tet* koji se opisuju u enterobakterija su *tet(A)* – *tet(E)* (47, 82).

U enterobakterija, rezistencija na kinolone javlja se kao posljedica promjena u enzimima koji su primarna ciljna mjesta djelovanja antibiotika (DNA giraza i topoizomeraza IV) ili smanjenja koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici zbog promjena u permeabilnosti bakterijske stijenke. Oba mehanizma rezistencije su posljedica mutacija kromosomskih gena i do nedavnog otkrića plazmidnih gena rezistencije na kinolone, smatralo se da su mutacije kromosomskih gena jedini način na koji se rezistencija na kinolone može ispoljiti. Geni *qnr* kodiraju proteine s pentapeptidnim ponavljajućim sljedovima koji se vežu za DNA girazu, no točan mehanizam na koji proteini *qnr* štite DNA girazu još nije otkriven. Prisutnost gena *qnr* smanjuje maksimalnu učinkovitost kinolona pružajući bakterijama produženi vremenski okvir u kojem dolazi do mutacija i razvoja efikasnijih mehanizama rezistencije na kinolone. Trenutno je poznato 5 skupina gena *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) i svi dijele isti mehanizam djelovanja (76, 83).

Geni koji su odgovorni za rezistenciju na kloramfenikol uglavnom se nalaze na plazmidima u sklopu transpozona. Rezistencija na kloramfenikol kod enterobakterija uglavnom se bazira na modifikaciji antibiotika kloramfenikol acetyltransferazama (CAT). Danas su poznate 3 skupine ovih enzima koje nemaju genetičkih i evolucijskih sličnosti. Rezistenciji na kloramfenikol mogu doprinosti i efluks pumpe koje izbacuju kloramfenikol iz stanice, no zastupljenost ovog mehanizma u klinički bitnih enterobakterija je zanemariv. Najznačajnije efluks pumpe uključene u rezistenciju na kloramfenikol su floR i cmlA (47, 84).

## **1.8. ULOGA MOLEKULARNE EPIDEMIOLOGIJE U PREĆENJU ŠIRENJA ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBEPENEME**

Rizični bakterijski klonovi, u epidemiološkom smislu, važni su pokretači širenja rezistencije na antibiotike na globalnom nivou. Njihovo je klonsko širenje odgovorno za širenje gena rezistencije vertikalnim putem, no u isto vrijeme služe kao rezervoar gena koji se horizontalnim prijenosom šire u ostale bakterije s kojima dijele ekološke niše (9, 25). Termin „bakterijski klon“ odnosi se na ukupno potomstvo koje je binarnom diobom nastalo iz jedne bakterijske stanice, odnosno čine ga genetički srodni izolati koji su potekli od istog pretka (85). Zbog velike plastičnosti bakterijskih genoma koja se javlja uslijed čestih genskih preslagivanja proizašlih iz delecija, insercija i rekombinacija, mora se očekivati određena genetička varijabilnost među predstavnicima istog klona (86). Zbog navedenog, u bakteriologiji se pojam „bakterijski klon“ ne definira na striktan način i čine ga izolati koji su, ovisno o metodi genotipizacije, okarakterizirani kao identični ili jako slični (25). U ovom je kontekstu važno naglasiti definicije „izolata“, „soja“ i „klona“. Izolat je opći pojam koji se odnosi na čistu bakterijsku kulturu koja je dobivena iz jedne bakterijske kolonije s primarne podloge dobivene iz kliničkog materijala ili uzorka. Bakterijski izolat odnosi se na mikroorganizam poznatog roda i vrste, pri čemu su ostale karakteristike mikroorganizma uglavnom nepoznate. Izolat(i) su predstavnici određenog soja, pri čemu pojam „soj“ deskriptivno diskriminira bakterije unutar iste vrste i odnosi se na jedan ili skupinu izolata istih fenotipskih i genotipskih obilježja. Ne postoji univerzalni kriterij prema kojem se točno definira soj, no sojevi se međusobno moraju međusobno razlikovati ovisno o metodi fenotipske ili genotipske tipizacije. Razlika između „soja“ i „klona“ je još kompleksnija, posebice jer logika nalaže da se pod pojmom „klon“ i „soj“ opisuju izolati koji su potekli od istog pretka. Konsenzus je da se pojmom „klon“ opisuju izolati koji neovisno o različitim geografskim lokacijama, uzorcima, i vremenskim periodima izolacije, posjeduju jako slične fenotipske i genotipske karakteristike što implicira njihovu povezanost sa zajedničkim pretkom (87, 88).

Aspekt klonalnosti od ključne je važnosti u molekularnoj epidemiologiji poglavito u situacijama kada je nužno odrediti poveznice među izolatima prikupljenim na različitim geografskim područjima jer je poznato da patogene bakterije iste vrste nemaju uniforman epidemijski potencijal što se manifestira češćom prevalencijom nekih klonova ili njihovih klonskih grupa (25). Važno je naglasiti da identifikacija klonalnosti analiziranih izolata uvelike ovisi o metodi koja se koristi u svrhu molekularne genotipizacije. Trenutno postoji veliki broj različitih metoda molekularne genotipizacije koje se koriste u epidemiološke svrhe



od koji su najznačajnije „Multilocus sequence typing“ (MLST) i gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (eng „Pulsed-Field Gel electrophoresis“, PFGE) . Uz navedeno, u manjoj se mjeri koriste metode genotipizacije koje se baziraju na lančanoj reakciji polimerazom kojom se analiziraju repetitivni intergenski konsenzus-elementi enterobakterija (ERIC), nasumično amplificirana polimorfna DNA (RAPD) te „multilocus variable-number tandem-repeat analysis“ (MLVA) (25).

MLST je metoda koja se temelji na određivanju slijeda nukleotida u setu od sedam do deset konzerviranih tzv. “housekeeping“ gena što ju čini prikladnom metodom za kontinuirano epidemiološko praćenje na globalnom nivou s obzirom da reproducibilnost rezultata omogućuje usporedbu podataka među različitim laboratorijima (89). Srodnost među izolatima utvrđuje se na temelju polimorfizama uočenih u konzerviranim genima, što za uzvrat omogućuje analizu populacijske strukture i identifikacije globalno raširenih klonovih tipova (eng. „sequence type“, ST) odnosno klonova (89). S druge strane, nedostatak MLST metode je smanjena rezolucija i nemogućnost uočavanja suptilnih razlika među izolatima prikupljenim tijekom epidemija koje se javljaju na malim geografskim područjima ili unutar određene zdravstvene ustanove (25, 66).

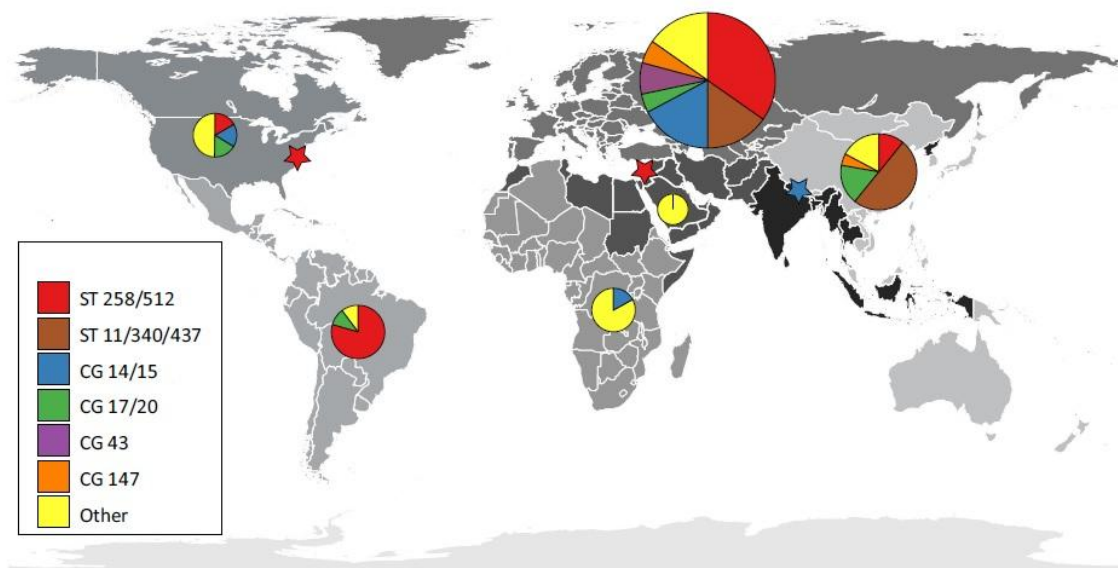
PFGE je metoda koja se preferabilno koristi u genotipizaciji izolata prikupljenih tijekom epidemija koje se javljaju na užem geografskom području pri čemu omogućuje identifikaciju epidemijskih klonova. Ova metoda temelji se na makrorestrikciji ukupne bakterijske DNA određenim restrikcijским enzimom, nakon čega se gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju dobivaju makrorestrikcijški profili DNA odsječaka koji se koriste u daljnjoj analizi genetičke srodnost analiziranih izolata (90). PFGE karakterizira visoka razina diskriminacije, a kriteriji definiranja klonovih kategorija, tj. PFGE grupa interpretiraju se prema naputcima iznesenim u studiji Tenover i suradnika iz 1995. godine (88). Za razliku od MLST metode, PFGE karakterizira smanjena reproducibilnost koja uvelike ovisi o aparaturi i kvaliteti reagensa te vještini laboratorijskog osoblja (25, 66).

Enterobakterije koje rezistenciju na karbapeneme ne ispoljavaju proizvodnjom karbapenemaza uglavnom karakterizira nizak epidemijski potencijal širenja. Kao što je već navedeno, rezistencija se u ovakvih bakterija bazira na smanjenju propusnosti vanjske membrane. Ovakav mehanizam negativno utječe na kompetitivnost, zbog čega se rezistentni izolati pojavljuju nasumično, te je širenje takvih klonova vrlo ograničeno. Iz perspektive molekularne epidemiologije, populaciju izolata enterobakterija rezistentnih na karbapeneme karakterizira izrazita poliklonska genetička pozadina. (4, 8, 25).

S druge strane, rezistencija na karbapeneme posredovana karbapenemazama puno manje opterećuje bakterijske stanice, a sprega određenih klonova i plazmida koje nose gene za karbapenemaze čak pokazuje i sinergističke značajke. Ovakva sprega bakterije čini izrazito kompetentnima u kliničkim uvjetima iznimnog selekcijskog pritiska prouzrokovanog upotrebom antibiotika. Višestruko rezistentan fenotip, uz otpornost na karbapeneme, u kombinaciji s klonovima koji prirodno posjeduju prilagodbe za efikasno širenje uvelike smanjuje genetičku varijabilnost populacije enterobakterija koje proizvode karbapenemaze (25, 55).

Epidemijski rizične, višestruko rezistentne, bakterijske klonove karakterizira široka globalna rasprostranjenost i visok stupanj perzistencije (91). Da bi se određeni klon mogao okarakterizirati kao rizičan mora biti globalno raširen, višestruko rezistentan i patogen. Uz navedeno mora ga karakterizirati veliki potencijal prijenosa i kolonizacije, njegova perzistencija u koloniziranim sredinama mora biti dugotrajna, uz opetovan izazivanje teških infekcija (25). Takvi klonovi uglavnom posjeduju adaptacije koje ih čine izrazito kompetitivnima u kliničkoj sredini. Njihova perzistentnost, s druge strane, omogućuje im stjecanje dodatnih gena rezistencije horizontalnim prijenosom, pri čemu u isto vrijeme služe kao rezervoar za širenje determinanti rezistencije (26).

Do sada su u nekoliko klonskih tipova *K. pneumoniae* uočene karakteristike koje odlikuju rizične epidemijske klonove. Među takvim klonovima treba istaknuti ST14, ST37 i ST147 dok je ST258 prepoznat kao visoko rizičan, globalno rašireni klon (Slika 9.) (25). S obzirom da je MLST shema za analizu izolata *E. cloacae* uvedena tek 2013. godine, epidemiološki podatci u znanstvenoj literaturi puno su oskudniji od onih za vrstu *K. pneumoniae* (92). Iako su u vrste *E. cloacae*, klonski tipovi ST66, ST78, ST108 i ST114 identificirani kao potencijalno rizični klonovi, niti jedan od njih ne karakterizira epidemijski potencijal koji je vidljiv kod klonskog tipa ST258 *K. pneumoniae* (93).



**Slika 9.** Globalna distribucija najučestalijih klonskih tipova *K. pneumoniae* povezanih sa širenjem rezistencije na karbapeneme. Svaki grafikon se odnosi na određeno geografsko područje označeno posebnom nijansom sive boje. Slika preuzeta iz studije Wyres i suradnika iz 2016. godine (94).

## 1.9. ULOGA PLAZMIDA U ŠIRENJU REZISTENCIJE NA KARBAPENEME

Raširenost gena za rezistenciju na antibiotike velikim je dijelom posljedica horizontalnog prijenosa gena među bakterijama istih ili različitih vrsta (95). Najistaknutiju ulogu u horizontalnom prijenosu gena rezistencije zasigurno imaju plazmidi. Plazmidi su izvankromosomske molekule DNA koje su sposobne autonomno se replicirati i na bitan način doprinose formiranju bakterijskog rezistoma. Često sadrže gene za rezistenciju na beta-laktame, aminoglikozide, tetracikline, kloramfenikol, sulfonamide, trimetoprim, makrolide i kinolone (56). Vezano nasljeđivanje velikog broja gena rezistencije za različite klase antibiotika posljedica je lokaliziranosti ovih gena na istom plazmidu (*in cis*) što često pozitivno doprinosi kompetitivnosti bakterija u uvjetima selekcijskog pritiska proizašlog iz istovremene primjene različitih antibiotika.

Plazmidi koji se povezuju sa širenjem višestruke rezistencije su uglavnom konjugabilni, veći su od 50 kb i nose gene uključene u složene mehanizme kontrole replikacije, odnosno njihove brojnosti u bakterijskoj stanici (96). Zbog autonomne replikacije i horizontalnog širenja, doseg i frekvencija evolucijskih promjena kroz koje prolazi plazmidna molekula DNA često se moraju promatrati neovisno od promjena kroz koje prolazi bakterijski kromosom. Veliki dio plazmidne molekule DNA često karakterizira značajna plastičnost koja je posljedica prisutnosti različitih mobilnih genetičkih elemenata, poput transpozona i insercijskih sekvenci. Ovakva varijacija u plazmidnoj DNA uvelike otežava karakterizaciju

plazmida, utvrđivanje srodnosti i njihove evolucijske prošlosti čak i kad se primjenjuju najsuvremenije metode sekvenciranja (25). Usprkos varijabilnosti plazmida u njihovoj tipizaciji veliku ulogu ima analiza replikona. Replikoni su konzervirane regije plazmidne molekule DNA koje su ključne za proces replikacije. Zaduženi su za kontrolu broja kopija plazmida u bakterijskoj stanici pri čemu definiraju i spektar bakterijskih vrsta u kojima plazmidi mogu opstati (56). Plazmidi koji imaju isti replikon su inkompatibilni i svrstavaju se u istu skupinu inkompatibilnosti (97). Ovakav sustav klasifikacije olakšava usporedbu, identifikaciju i karakterizaciju plazmida analiziranih u različitim bakterijskim vrstama, na različitim geografskim područjima, u različitim vremenskim razdobljima (98, 99).

Epidemiološki najznačajniji plazmidi spadaju u 6 skupina inkompatibilnosti: IncF, IncA/C, IncI, IncHI, IncN i IncL/M (98). Prema potencijalu širenja u različite bakterijske vrste, plazmidi se dijele na one koji su vezani uz uzak spektar bakterijskih vrsta (npr. IncF) i na one koji se mogu naći u velikom broju različitih bakterijskih vrsta (npr. IncA/C, IncL/M, IncN) (98, 100).

Tipizacija replikona lančanom reakcijom polimerazom (eng „PCR-based replicon typing“, PBRT) je standardna metoda koja se primjenjuje u identifikaciji replikona najčešćih skupina plazmida u enterobakterija i predstavnika roda *Acinetobacter* (99, 101). Replikoni se koriste kao marker u tipizaciji bakterija, analizi širenja epidemijskih klonova ili za praćenje širenja rezistencije u kolekciji epidemijski povezanih, no genetički nesrodnih bakterijskih izolata. Kako bi se zbog velikog broja različitih plazmida u bakterijskoj stanici izbjegla pogrešna identifikacija, karakterizacija plazmida koji nosi promatrani gen rezistencije zahtjeva prijenos plazmida konjugacijom ili transformacijom u osjetljivi, recipijentni bakterijski soj bez plazmida (56).

Plazmidi igraju vrlo važnu ulogu u globalnom širenju karbapenemaza (56). Geni koji kodiraju karbapenemazu KPC do sada su opisani u plazmidima koji spadaju u IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR i ColE skupine inkompatibilnosti (25, 102). Uz navedeni gen, ovi plazmidi redovito nose gene rezistencije na aminoglikozide, kinolone, trimetoprim, sulfonamide i tetracikline te često doprinose širenju višestruke rezistencije (102). Iako je gen *bla<sub>KPC</sub>* detektiran u heterogenoj skupini plazmida, gen koji kodira ovu karbapenemazu pretežno se povezuje s plazmidima IncFII skupine inkompatibilnosti (25).

Gen *bla<sub>NDM-1</sub>* je do sada identificiran na plazmidima nekoliko različitih skupina inkompatibilnosti: IncL/M, IncA/C, IncF, IncH, IncR i IncN (56, 64, 103). Od navedenih skupina plazmida, najveća povezanost gena *bla<sub>NDM-1</sub>* uočena je s plazmidima IncA/C i IncHII

(56). Navedeni plazmidi često nose velik broj gena odgovornih za rezistenciju na različite klase antibiotika, poglavito na aminoglikozide, kloramfenikol, trimetoprim i sulfonamide (56, 104).

Geni *bla*<sub>VIM</sub> nisu vezani za specifične plazmide te se nalaze na plazmidima različitih skupina inkompatibilnosti (IncA/C, IncR, IncHI2, IncI1 i IncW), iako je u ranim fazama širenja gen *bla*<sub>VIM-1</sub> često opisivani u kontekstu plazmida iz IncN skupine (36). U Italiji i Grčkoj gen *bla*<sub>VIM-1</sub> najčešće se detektira na raznolikim plazmidima koji spadaju u IncN skupinu inkompatibilnosti (105). Plazmidi IncN skupine inkompatibilnosti uglavnom su odgovorni za poliklonsko širenje gena *bla*<sub>VIM-1</sub> među vrstom *K. pneumoniae* i karakterizira ga vrlo perzistentna priroda (56, 105). Često nosi dodatne gene rezistencije, poglavito one koji su odgovorni za rezistenciju na kinolone i aminoglikozide (56).

Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> povezuje se s plazmidom IncL/M skupine inkompatibilnosti veličine ~60 kb koji, uz navedeni gen, ne nosi dodatne gene rezistencije (56). Plazmidi IncL/M su konjugabilni i široko su rasprostranjeni među različitim bakterijskim vrstama enterobakterija (98). Plazmidi ove skupine inkompatibilnosti odgovorni su za širenje velikog broja različitih gena za rezistenciju na antibiotike, uključujući beta-laktamaze proširenog spektra, beta-laktamaze AmpC te karbapenemaze iz Amblerovih klasa A, B i D (95). Smatra se da su plazmidi IncL/M skupine inkompatibilnosti prvotno bili endemični na području Sredozemlja, no s vremenom su postali odgovorni za širenje gena rezistencije na antibiotike među enterobakterijama na globalnoj razini (106).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

S obzirom da se karbapenemi koriste kao antibiotici posljednje linije obrane u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim enterobakterijama otpornim na cefalosporine proširenog spektra, rastuća prevalencija enterobakterija rezistentnih na karbapeneme zabrinjavajući je problem koji je poprimio globalne razmjere (8, 15). Rezistencija na karbapeneme u enterobakterija ispoljava se kroz dva mehanizma (4). Proizvodnja karbapenem hidrolizirajućih beta-laktamaza efikasniji je mehanizam rezistencije koji utječe na antibakterijsku aktivnost svih karbapenema. Iako je do sada otkriven velik broj strukturno i funkcionalno različitih beta-laktamaza koje hidroliziraju karbapeneme, KPC, VIM, NDM i OXA-48 klinički su najznačajnije karbapenemaze čije globalno širenje nije zaobišlo niti područje Republike Hrvatske (27, 29, 33, 36). Rezistencija na karbapeneme koja se ne temelji na proizvodnji karbapenemaza uglavnom negativno utječe na antibakterijsku aktivnost ertapenema i proizlazi iz sinergije smanjene propusnosti bakterijske stanice za antibiotike i proizvodnje beta-laktamaza proširenog spektra i AmpC (4, 40).

Proizvodnja karbapenemaza u enterobakterija često se povezuje s klonovima povećanog epidemijuskog potencijala širenja koji su nerijetko odgovorni za internacionalno ili čak globalno širenje rezistencije na karbapeneme. Zbog dominacije klonskog širenja, enterobakterije koje proizvode karbapenemaze često karakterizira smanjena genetička raznolikost, odnosno uniformna genetička pozadina (36, 54). Smanjena propusnost vanjske membrane enterobakterija javlja se nasumično, kao posljedica mutacija koje direktno ili indirektno utječu na ekspresiju i funkcionalnost porinskih kanala (26, 38). Opće prihvaćeno mišljenje u znanstvenoj literaturi je da smanjena propusnost vanjske membrane enterobakterija negativno utječe na adaptivnu vrijednost genotipa (eng. „fitness“) bakterija, zbog čega ovakvi mutanti pokazuju smanjeni potencijal širenja koji proizlazi iz smanjene kompetitivnosti (8). Zbog navedenog, enterobakterije koje rezistenciju na karbapeneme ne ispoljavaju proizvodnjom karbapenemaza karakterizira poliklonska genska pozadina, odnosno povećana genska raznolikost (8, 51).

Izolati enterobakterija koji nisu osjetljivi na karbapeneme redovito se, u znanstvenoj literaturi, opisuju kao višestruko rezistentni (24, 70). Iako mehanizmi rezistencije na karbapeneme podrazumijevaju i rezistenciju na gotovo sve klase beta-laktamskih antibiotika, enterobakterije rezistentne na karbapeneme često su rezistentne i na aminoglikozide, sulfonamide, tetracikline, kloramfenikol i fluorokinolone (36). Podlogu višestruko rezistentnog fenotipa čini velik broj gena za rezistenciju na različite klase antibiotike koji se, uz gene koji kodiraju karbapenemaze, ESBL i beta-laktamaze AmpC, nalaze zajedno na istim (*in cis*) ili različitim plazmidima (*in trans*) (21, 36, 107).

Gotovo sve klinički važne karbapenemaze kodiraju geni koji su smješteni na plazmidima čime su zadovoljeni preduvjeti za horizontalni prijenos rezistencije na karbapeneme među enterobakterijama iste ili različitih vrsta (25, 56).

U ovom radu istraživanje će se provesti na zbirci izolata prikupljenih tijekom 2011. i 2012. godine na području RH, kroz redovitu aktivnost Nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike. Zbirka će biti sačinjena od izolata enterobakterija kod kojih je utvrđena neosjetljivost na jedan od karbapenema prema smjernicama EUCAST-a (ertapenem >0,5 mg/L, imipenem/meropenem > 2 mg/L )(67).

Uz testiranje osjetljivost na karbapeneme i utvrđivanje proizvodnje karbapenemaza fenotipskim metodama, provest će se testiranje osjetljivosti i na ostale klase antibiotika, a molekularno-biološkim metodama detektirati će se i identificirati geni odgovorni za rezistenciju na karbapeneme i višestruko rezistentan fenotip. Mehanizmi koji dovode do smanjenja koncentracije karbapenema u bakterijskoj stanici analizirati će se mjerenjem relativne ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale i efluks pumpe.

Statističkom analizom  $\chi^2$  testom (hi-kvadrat test) utvrdit će se postoji li razlika u profilu rezistencije na karbapeneme između izolata koji proizvode, odnosno ne proizvode karbapenemaze. Istovjetna analiza između dvije navedene skupine izolata koristit će se i pri usporedbi profila rezistencije na ostale klase antibiotika te prevalencije gena za rezistenciju na ostale klase antibiotika. Razine relativne ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale i efluks pumpe usporediti će se između skupine koju čine izolati koji proizvode karbapenemaze i skupine koju čine izolati koji proizvode karbapenemaze. Statistička analiza rezultata dobivenih mjerenjem razine relativne ekspresije gena kvantitativnom lančanom polimerazom u realnom vremenu provest će se koristeći program REST 2009.

Metodama genotipizacije (PFGE i MLST) analizirati će se molekularna epidemiologija analiziranih izolata pri čemu će se naglasak staviti na usporedbu genetičke varijabilnosti između izolata koji proizvode i izolata koji ne proizvode karbapenemaze. Pretpostavka je da bi izolati koji ne proizvode karbapenemaze trebali prikazivati povećanu genetičku varijabilnost u odnosu na izolate koji proizvode karbapenemaze.

Plazmidni smještaj gena koji kodiraju karbapenemaze analizirati će se S1-PFGE metodom i hibridizacijom prema Southernu samo kod izolata koji proizvode karbapenemaze i u odgovarajućih transkonjugata. Tipizacija plazmida PBRT metodom trebala bi pružiti uvid u potencijal njihovog horizontalnog širenja.

S obzirom da Republika Hrvatska spada u dio Europe koji karakterizira manjak sustavnih istraživanja na nacionalnoj razini, ovo će istraživanje pružiti detaljan uvid u



prevalenciju mehanizama rezistencije kojima su enterobakterije ispoljavale rezistenciju na karbapeneme tijekom 2011. i 2012. godine na području RH. Rasvijetliti će epidemiološku sliku koja leži u pozadini širenja enterobakterija rezistentnih na karbapeneme, kao što će i pozicionirati epidemiološku sliku u globalnom kontekstu. Budući da se radi o čestom uzročniku bolničkih infekcija s velikim potencijalom širenja i u izvanbolničkom okruženju, na osnovi opisanih mehanizama rezistencije i distribuciji rezistentnih sojeva moći će se donijeti zaključci koji će pomoći u razvoju strategije sprječavanja i liječenja infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim izolatima bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*.

**Hipoteze istraživanja:**

H1. Smanjena osjetljivost na karbapeneme u enterobakterija u Hrvatskoj najčešće nije posredovana proizvodnjom karbapenemaza.

H2. Rezistencija na karbapeneme se udruženo nasljeđuje s rezistencijom na druge grupe antibiotika.

H3. Sojevi koji proizvode karbapenemaze su monoklonskog porijekla.

**Ciljevi istraživanja:**

1. Definirati mehanizme višestruke rezistencije u enterobakterija sa smanjenom osjetljivosti na karbapeneme u hrvatskim bolnicama.

2. Odrediti distribuciju gena za rezistenciju na plazmidima i odrediti potencijal horizontalnog širenja.

3. Utvrditi postoji li klonska povezanost višestruko rezistentnih sojeva.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. POPIS MATERIJALA

#### 3.1.1. KEMIKALIJE I REAGENSI

- Agaroza (Sigma Life Science, SAD)
- Agaroza niskog tališta („Agarose Low Melting“, Eurobio, Francuska)
- Agaroza za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju („Pulsed Field Certified™ Agarose“, Bio-Rad, Laboratories, SAD)
- Borna kiselina (Sigma Life Science, SAD)
- Deionizirani formamid („Hi-Di™ Formamide“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Etanol 96% (Kemig d.o.o., Republika Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma Life Science, Njemačka)
- Glicerol (Kemig d.o.o., Republika Hrvatska)
- Izopropanol (CLARO-PROM d.o.o., Republika Hrvatska)
- Kloroform (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina (Merck, Njemačka)
- Lauroil-sarkozin (Sigma Life Sciences, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrijev dodecil-sulfat (Sigma, Njemačka)
- Ledena octena kiselina (95%) (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska)
- Natrijev acetat (Sigma Aldrich, Japan)
- Natrijev azid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Natrijev citrat (Sigma Aldrich, Belgija)
- Natrijev hidroksid (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska)
- Natrijev klorid (Sigma Life Sciences, Njemačka)
- Reagens za izolaciju RNA, DNA i proteina („TriPure“, Roche, Švicarska)
- Sterilna ultra-čista voda („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka)
- Sterilna ultra-čista voda tretirana dietil-pirokarbonatom („Ambion® DEPC-Treated Water“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Tris-baza („Trizma® base“, Sigma Life Science, SAD)
- Tris-hidroklorid („Trizma® hydrochloride“, Sigma Life Science, SAD)

### 3.1.2. ANTIBIOTICI I INHIBITORI BETA-LAKTAMAZA

Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom:

- Amoksisilin (20 µg)
- Amoksisilin/klavulanska kiselina (20/10 µg)
- Amoksisilin/klavulanska kiselina (10/10 µg)
- Cefaleksin (30 µg)
- Cefoksitin (30 µg)
- Cefuroksim (30 µg)
- Ceftriakson (30 µg)
- Ceftazidim (10 µg)
- Ceftazidim (30 µg)
- Cefepim (30 µg)
- Ertapenem (10 µg)
- Imipenem (10 µg)
- Meropenem (10 µg)
- Piperacilin/tazobaktam (30/6 µg)
- Gentamicin (10 µg)
- Amikacin (30 µg)
- Trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg)
- Ciprofloksacin (5 µg)

Proizvođač svih gore navedenih diskova s antibioticima je Mast Group iz Ujedinjenog Kraljevstva

- Kloksacilin disk (500 µg) (Rosco Diagnostica, Danska)

Trakice s gradijentom antibiotika za epsilometarski test (E-test):

- ETEST<sup>®</sup> Ertapenem (Biomerieux, Francuska)
- ETEST<sup>®</sup> Imipenem (Biomerieux, Francuska)
- ETEST<sup>®</sup> Meropenem (Biomerieux, Francuska)

Antibiotici koji se dodaju u selektivne hranjive podloge:

- Meropenem prašak za otopinu za injekciju ili infuziju (Sandoz<sup>®</sup>, Republika Hrvatska)
- Rifampicin (sadržaj iz „Rimactan 300 mg tvrde kapsule“, Pliva d.o.o., Republika Hrvatska)
- Kloksacilin (Flukloksacilin prašak za otopinu za injekciju ili infuziju, Altamedics d.o.o., Republika Hrvatska)

Komercijalni diskovi natopljeni inhibitorom beta-laktamaza:

- Dipikolonična kiselina disk (Rosco Diagnostica, Danska)
- Boronična kiselina disk (Rosco Diagnostica, Danska)

### 3.1.3. HRANJIVE PODLOGE I MEDIJI

Sastojci hranjivih podloga i medija:

- Agar (BAG Med. AG, Njemačka)
- Bakto-tripton (BAG Med. AG, Njemačka)
- Ekstrakt kvasca (Institut Torlak, Republika Srbija)
- Natrijev klorid (Sigma Life Sciences, Njemačka)

Luria-Bertani broth (LB medij):

10 g/L Bakto-tripton  
5 g/L Ekstrakt kvasca  
10 g/L NaCl  
pH 7,5

Luria-Bertani agar (LB agar):

10 g/L Bakto-tripton  
5 g/L Ekstrakt kvasca  
10 g/L NaCl  
15 g/L Agar  
pH 7,5

Gotove komercijalne hranjive podloge:

- Mueller-Hinton agar (MH agar) („Mueller Hinton Medium“, Becton Dickinson, Njemačka)
- Krvni agar (5% konjska krv, „Blood agar base“, BioRad, SAD)

Hranjive podloge s dodatkom antibiotika:

- LB medij s dodatkom meropenema (0,5 mg/L)
- LB medij s dodatkom natrijevog azida (150 mg/L) i rifampicina (256 mg/L)
- LB agar s dodatkom meropenema (0,5 mg/L)
- LB agar s dodatkom natrijevog azida (150 mg/L) i rifampicina (256 mg/L)
- LB agar s dodatkom meropenema (0,5 mg/L), natrijevog azida (150 mg/L) i rifampicina (256 mg/L)
- MH agar s dodatkom kloksacilina (250 µg/L)

#### 3.1.4. BOJE

- Sybr<sup>®</sup> Safe (Thermo Fisher Scientific, SAD).
- Ksilen-cijanól (Sigma Life Science, SAD)
- Bromfenol-plavo (Fluka Analytical, Švicarska)

6 X pufer za nanošenje uzoraka (0,25% m/v bromfenol-plava, 0,25% m/v ksilen-cijanól, 30% v/v glicerol)

#### 3.1.5. STANDARDI MOLEKULSKIH MASA

- „GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- „CHEF DNA Size Standard“ (Bio-Rad Laboratories, SAD)

#### 3.1.6. ENZIMI, PROTEINI I PRIPADAJUĆI REAKCIJSKI PUFERI

- Alkalna fosfataza škampa („FastAP<sup>™</sup>“, 1 U/ $\mu$ L, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- DNaza („Turbo<sup>™</sup> DNase“, 2 U/ $\mu$ L, ThermoFisher Scientific, SAD)
- 10 X „Turbo<sup>™</sup> DNase Buffer“ (ThermoFisher Scientific, SAD)
- Egzonukleaza I („Exonuclease I“, 20 U/ $\mu$ L, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Hot Start Taq-polimeraza („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka)
- 10 X „HotStart Buffer complete“ (Jena Bioscience, Njemačka)
- M-MLV reverzna transkriptaza („Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“, 200 U/ $\mu$ L, Promega, SAD)
- 5 X pufer „M-MLV RT“ („M-MLV RT 5X Buffer“, Promega, SAD)
- Nukleaza S1 („S1 Nuclease“, 100 U/ $\mu$ L, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 5 X Reakcijski pufer za S1-nukleazu („5X Reaction Buffer for S1 Nuclease“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Proteinaza K (20 mg/mL) („Proteinase K“, Qiagen, Njemačka)
- Inhibitor RNaze („RNasin<sup>®</sup> Inhibitor“, Promega, SAD)
- XbaI (XbaI, 10 U/ $\mu$ L, Thermo Scientific, SAD)
- 10 X Pufer Tango za restrikcijski enzim XbaI („10X Buffer Tango“, Thermo Scientific, SAD)



### 3.1.7. SPECIFIČNE KOMERCIJALNE SMJESE REAGENCIJA – KOMPLETI

- „ABI PRISM BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I“ (Roche, Švicarska)
- „QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Njemačka)
- „Quantitect<sup>®</sup> Sybr<sup>®</sup> Green PCR Kit“ (Qiagen, Njemačka)

### 3.1.8. NUKLEINSKE KISELINE

- Smjesa deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp<sup>®</sup> dNTP blend“, 2,5 mM svaki, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Nasumične heksamerne početnice („Random Primers – hexamers“, Promega, SAD)
- Nukleotidni sljedovi početnica koje su korištene za detekciju i amplifikaciju gena lančanom reakcijom polimerazom i u reakcijama sekvenciranja prikazani su u tablicama 1 do 6 (proizvođač svih početnica: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD)

**Tablica 1.** Početnice korištene za detekciju gena rezistencije lančanom reakcijom polimerazom koje su preuzete iz dostupne literature.

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Ta (°C)	Veličina ampikona (pb)	Ref.
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM f	ATGGAATTGCCCAATATTATGC	57	813	(108)
	NDM r	TCAGCGCAGCTTGTCGG			
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	57	744	(109)
	OXA-48B	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
Grupa <i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	M13U	GGTAAAAAATCACTGCGTC	55	864	(110)
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
Grupa <i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	M25U	ATGATGACTCAGAGCATTTCG		866	
	M25L	TGGGTTACGATTTTCGCCCGC			
Grupa <i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	M9U	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA		870	
	M9L	CCCTTCGGCGATGATTCTC			
<i>bla<sub>MOX</sub></i>	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	462	(49)
	MOXMR	CACATTGACATAGTGTGGTGC			
<i>bla<sub>CIT</sub></i>	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462		
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
<i>bla<sub>DHA</sub></i>	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405		
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			
<i>bla<sub>ACC</sub></i>	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346		
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC			
<i>bla<sub>EBC</sub></i>	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG	302		
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
<i>bla<sub>FOX</sub></i>	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190		
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
<i>qnrA</i>	<i>QnrAF</i>	ATTTCACGCCAGGATTTG	516	469	(111)
	<i>QnrAR</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
<i>qnrB</i>	<i>QnrBF</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469		
	<i>QnrBR</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
<i>qnrS</i>	<i>QnrSF</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417		
	<i>QnrSR</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
<i>aadA1/2</i>	AadA-F	GCAGCGCAATGACATTCTTG	282	454	(112)
	AadA-R	ATCCTTCGGCGCGATTTTG			
<i>aadA5</i>	aadA5 F	CTTCAGTTTCGGTGAGTGGC	58		
	aadA5 R	CAATCGTTGCTTTGGCATAT			
<i>aac(3')-I</i>	aac(3')-I F	ACCTACTCCCACATCAGCC	169	237	
	aac(3')-I R	ATATAGATCTCACTACGCGC			
<i>aac(3')-II</i>	aac(3')-II F	ACTGTGATGGGATACGCGTC	237		
	aac(3')-II R	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA			
<i>aac(3')-III</i>	aac(3')-III F	CACAAGAACGTGGTCCGCTA	185	286	
	aac(3')-III R	AACAGGTAAGCATCCGCATC			
<i>aac(3')-IV</i>	aac(3')-IV F	CTTCAGGATGGCAAAGTTGGT	286		
	aac(3')-IV R	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT			
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3')-Ia F	ATGGGCTCGCGATAATGTC	600	680	
	aph(3')-Ia R	CTCACCGAGGCAGTTCCAT			
<i>aph(3')-II</i>	aph(3')-II	GAACAAGATGGATTGCACGC	680		
	aph(3')-II	GCTCTTCAGCAATATCACGG			
<i>ant(2'')</i>	ant(2'') F	ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG	187	482	(113)
	ant(2'') R	CGTCAGATCAATATCATCGTGC			
<i>aac(6')-Ib</i>	aac6-Ib_F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482		
	aac6-Ib_R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC			
<i>armA</i>	armA-f	TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT	514	635	(114)
	armA-r	TCTTCCATTCCTTTCCTTT			
<i>rmtA</i>	rmtA-f	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC	635		
	rmtA-r	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC			
<i>rmtB</i>	rmtB-f	TCAACGATGCCCTCACCTC	459		
	rmtB-r	GCAGGGCAAAGGTAATAATCC			
<i>rmtC</i>	rmtC-f	GCCAAAGTACTACAAGTGG	752		
	rmtC-r	CTCAGATCTGACCCAACAAG			
<i>rmtD</i>	rmtD-f	CTGTTTGAAGCCAGCGGAACGC	376		
	rmtD-r	GCGCCTCCATCCATTCCGAATAG			
<i>npmA</i>	npmA-f	CTCAAAGGAACAAAGACGG	641		
	npmA-r	GAAACATGGCCAGAAACTC			

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

Ref. - referenca

**Tablica 1.** - nastavak

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Ta (°C)	Veličina amplicona (pb)	Ref.
<i>tet(A)</i>	TetA F	GTAATTCTGAGCACTGTCCG	60	937	(112)
	TetA R	CTGCCTGGACAACATTGCTT			
<i>tet(B)</i>	TetB F	CTCAGTATTCCAAGCCTTTG	57	416	
	TetB R	CTAAGCACTTGTCTCCTGTT			
<i>tet(C)</i>	TetC F	TCTAACAATGCGCTCATCGT	60	570	
	TetC R	GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC			
<i>tet(D)</i>	TetD F	ATTACACTGCTGGACGCGAT	57	1104	
	TetD R	CTGATCAGCAGACAGATTGC			
<i>tet(E)</i>	TetE F	GTGATGATGGCACTGGTCAT	60	1179	
	TetE R	CTCTGCTGTACATCGCTCTT			
<i>cmlA</i>	cmlA F	TGTCATTTACGGCATACTCG	55	455	
	cmlA R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT			
<i>floR</i>	floR F	CACGTTGAGCCTCTATAT	55	868	
	floR R	ATGCAGAAGTAGAACGCG			
<i>sul1</i>	Sul1F	TGGTGACGGTGTTCGGCATT	62	790	
	Sul1R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG			
<i>sul2</i>	Sul2F	CGGCATCGTCAACATAACC	57	722	
	Sul2R	GTGTGCGGATGAAGTCAG			
Određivanje filogenetske skupine u vrste <i>E. coli</i>					
<i>ChuA</i>	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	55	279	(115)
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>YjaA</i>	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	55	211	
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1	GAGTAATGTCCGGGGCATTCA	55	152	
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

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

Ref. - referenca

**Tablica 2.** Početnice korištene za detekciju gena rezistencije lančanom reakcijom polimerazom koje su dizajnirane u ovom radu.

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Ta (°C)	Veličina amplicona (pb)	NCBI Accession no.	Položaj u genu
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPCF	AGTTCTGCTGTCTTGTCT	57	793	GQ140348	21-39
	KPCR	CTTGTCATCCTTGTAGGC				794-813
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Vimf	GGTGAGTATCCGACAGTC	57	442	AF317511	91-109
	Vimr1	CAGCACCRGGATAGAAGAG				513-532
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP-f1	GGYGTTTATGTTTCATACWTC	55	235	AF244145	98-117
	IMP-r1	GGATYGAGAATTAAGCCACTC				312-332
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEMF	GCGGTAAGATCCTTGAGAGT	57	620	AF495873	152-172
	TEMR	TACGATACGGGAGGGCTTA				752-771
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHVF	TTCGCCTGTGTATTATCTCC	57	494	AM941847	11-31
	SHVR	CGCCTCATTCAAGTTCCG				504-521
<i>bla<sub>VEB</sub></i>	vebF	ATGCCAGAATAGGAGTAGC	57	673	AF324833.1	119-138
	vebR	AATTGTCCATTCCGTAAGTAAT				768-791
<i>bla<sub>GES</sub></i>	gesF	CTAGCATCGGGACACAT	57	504	FN554543	319-336
	gesR	GACAGAGGCAACTAATTCG				803-822
<i>bla<sub>PER</sub></i>	PERF1	CTGGGCTCCGATAATGA	57	349	X93314 GQ396303	321-338
	PERF2	CTGGTCGCCWATGATGA				321-328/
	PERR	TGGTCCTGTGGTGGTT				653-669
<i>bla<sub>SME</sub></i>	smeF	GCTCAGGTATGACATTAGGT	57	350	Z28968	350-370
	smeR	CCAATCAGCAGGAACACTA				680-699

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

**Tablica 3.** Početnice korištene za određivanje slijeda nukleotida u genima koji kodiraju beta-laktamaze.

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Smjer	Ta (°C)*	Veličina amplikona (pb)	NCBI Accession no.	Položaj u genu	Ref.
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	blaKPC-F	TGTCACTGTATCGCCGTC	F	57	892	EU400222.2	2-20	(116)
	KPC-R	TTTTTCAGAGCCTTACTGCC	R				874-(10)	(117)
	KPCS1	GTATCCATCGCGTACAC	R				136-152	Ovaj rad
	KPCS2	CTGACAACAGGCATGAC	F				334-350	
	KPCS3	CAGACTGGGCAGTCGGAG	F				677-694	
<i>Bla<sub>NDM</sub></i>	NDM f	ATGGAATTGCCCAATATTATGC	F	57	813	JF703135	1-23	(108)
	NDM r	TCAGCGCAGCTTGTCCGG	R				796-813	
	NdmF	GTTTGGCGATCTGGTTT	F				135-152	Ovaj rad
	NdmR	GCCGTATGAGTGATTGC	R				771-788	
	NDM-2F	ACAAGATGGGCGGTATGGA	F				371-390	
	NDM-2R	CGTCCATACCGCCATCT	R				374-392	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	blaVIM1seq-1F	GTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTC	F	55	799	AF317511	3-31	Ovaj rad
	blaVIM1seq-1R	CTACTCGGCGACTGAGC	R				784-801	
	Vimf	GGTGAGTATCCGACAGTC	F				91-109	
	Vimr1	CAGACCRGGATAGAAGAG	R				513-532	
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	IS1999F	TGATGTTGTGCTTGGTTCGG	F	57	1983	HE617182.1	-1084-(-1064)	Ovaj rad
	oxa-48_seq_R_outer	TATGAGCCATTAACAACAAGCG	R				+79-(+100)	
	Oxa48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	F				31-50	(109)
	Oxa48B	GAGCACTTCTTTGTGATGGC	R				754-774	
	Tn1999_oxa48_7R	TCATTCCAGAGCACAACACTAC	R				127-146	Ovaj rad
	Tn1999_oxa48_8F	GGTTGAACTTGATGATAATGTGT	F				675-697	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-F	ATTCCTGAAGACGAAAAGGGC	F	57	1209	CP027536.1	-209-(-199)	(112)
	TEM-R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	R				+119-(+139)	
	TEMF	GCGGTAAGATCCTTGAGAGT	F				152-172	Ovaj rad
	TEMR	TACGATACGGGAGGGCTTA	R				753-772	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	F	53	883	S82452	-22-(-4)	(112)
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	R				842-861	
	SHVF	TTCGCCTGTGATTATCTCC	F				11-30	Ovaj rad
	SHVR	CGCCTCATTGAGTCCG	R				488-504	
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	F	55	864	AY044436	3-22	(110)
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	R				847-866	
	MA1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	F				208-227	
	MA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG	R				721-740	

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

\* - Ta navedena samo za početnice korištene u svrhu amplifikacije

Ref. - referenca

**Tablica 4.** Početnice korištene u analizi izolata *K. pneumoniae* i *E. cloacae* MLST metodom genotipizacije.

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Ta (°C)*	Veličina amplicona (pb)	Položaj u genu	Smjer	Ref.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							
<i>rpoB</i>	Vic3oF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA	55	1120	1368-1388	F	(118)
	Vic2oR	TTGTGAGCGGATAACAATTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC			2424-2444	R	(119)
	rpoB MLST 1f*	CCTGAAGGTCCGAACATC			1689-1707	F	Ovaj rad
<i>gapA</i>	gapA173oF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG	55	707	133-155	F	(118) (119)
	gapA181oR	TTGTGAGCGGATAACAATTCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT			772-796	R	
<i>mdh</i>	mdh130oF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG	55	801	64-85	F	
	mdh867oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG			801-821	R	
<i>pgi</i>	pgi1FoF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	55	~ 611	927-53	F	
	pgi1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT			1620-1645	R	
<i>phoE</i>	phoE604.1oF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	55	647	638-664	F	
	phoE604.2oRcv	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT			1220-1241	R	
<i>infB</i>	infB1FoF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG	55	507	0-21	F	
	infB1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC			442-463	R	
<i>tonB</i>	tonB1FoF	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	55	584	90-114	F	
	tonB2RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCAATTCGCGGCTGRGCRGAGAG			609-630	R	
	primer oF*	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA				F	
	primer oR*	TTGTGAGCGGATAACAATTC				R	
<i>Enterobacter cloacae</i>							
<i>dnaA</i>	dnaA-f2*	AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC	50	748	500-527	F	(92)
	dnaA-r	KGCCAGCGCCATCGCCACTGACGCGG			1222-1248	R	
	dnAAs2*	TTCTGACCTCGGATCGTTAT			300-320	F	
<i>fusA</i>	fusA-f2*	TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT	50	905	413-440	F	(92)
	fusA-r2	TCGCCAGACGCGCCAGAGCCAGACCCAT			1291-1318	R	
	fusA-r2-seq*	ATCTCTTCACGYTTGTTAGCGTGCATCT			1094-1121	R	
	fusA2*	CCACAGGTTACCAGGATGA			781-800	R	
<i>gyrB</i>	gyrB-f	TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA	50	1152	143-170	F	(92)
	gyrB-r	GCAGAACC GCCCGCGGAGTCCCTTTCCA			1268-1295	R	
	gyrB-r3-seq*	GCAGAACC GCCCGCGGAGTCCCTTTCC			1269-1295	R	
	gyrB-f3-seq*	AAAACCGGTACYATGGTGCGTTTCTGG			484-510	F	
<i>leuS</i>	leuS-f2*	GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGGAAG	50	844	1342-1369	F	
	leuS-r*	ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT			2159-2186	R	
<i>pyrG</i>	pyrG-f*	AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT	50	534	56-83	F	
	pyrG-r*	GCRGRATYTCVCCCTSHTCGTCACGC			563-590	R	
<i>rplB</i>	rplB-f*	GTAAACCGACATCTCCGGTCTGTCGCCA	50	745	17-44	F	
	rplB-r*	ACCTTTGGTCTGAACGCCACGGAGTT			735-762	R	
<i>rpoB</i>	rpoB-f*	CCGAACCGTTCCGCGAACATCGCGCTGG	57	748	252-280	F	
	rpoB-r2*	CCAGCAGATCCAGGCTCAGTCCATGTT			973-1000	R	

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

\* - Ta navedena samo za početnice korištene u svrhu amplifikacije

Ref. - referenca

**Tablica 5.** Početnice korištene u mjerenju relativne ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu u izolata *K. pneumoniae*, *E. cloacae* i *E. aerogenes*

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Smjer	Ta (°C)	Veličina ampikona (pb)	NCBI Accession no.	Položaj početnice	Ref.		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>										
<i>ompK35</i>	ompK35F	GCAATATTCTGGCAGTGGTGATC	F	55	109	KX528047.1	11-34	(39)		
	ompK35R	ACCATTTTCCATAGAAGTCCAGT	R				95-119			
<i>ompK36</i>	ompK36F	TTAAAGTACTGTCCCTCCTGG	F		130	MG577054.1	8-29			
	ompK36R	TCAGAGAAGTAGTGCAGACCGTCA	R				113-137			
<i>acrB</i>	acrBF	CAATACGGAAGAGTTGGCA	F		64	AJ318073.1	723-743	(120)		
	acrBR	CAGACGAACCTGGGAACC	R				768-786			
<i>rpoB</i>	rpoBF	AAGGCGAATCCAGCTTGTTACAGC	F		148	FO834906.1	1916-1939	(39)		
	rpoBR	TGACGTTGCATGTTCCGACCCATCA	R				2038-2063			
<i>Enterobacter cloacae</i>										
<i>ompC</i>	ompC (F)	AGAATTTGGCGGCGACACCTAC	F		60	145	CP001918.1	387-409	(121)	
	ompC (R)	TGCGCTACCGTTTTTACCCTGATA	R	507-531						
<i>ompF</i>	ompF (F)	CCGGCGTGAGCGATAACTTCTTCT	F	136		416-440				
	ompF (R)	AACGCATCGGTACGCTCATTTTTG	R			527-551				
<i>acrB</i>	acrB (F)	TCCGGGCGCAGAGAACAAGGTAGA	F	100		1908-1932				
	acrB (R)	TGCGGGCAGGTAAAGGCGAAGAC	R			1983-2007				
<i>rpoB</i>	rpoB (F)	CAGCCGCGAYCAGGTTGACTACA	F	63		1935-1958				
	rpoB (R)	GACGCACCGACGGATACCACCTG	R			1974-1997				
<i>Enterobacter aerogenes</i>										
<i>omp35</i>	EA_omp35_2F	CTGAAAGCGGGTGAATA	F	55		128		CP014029.2	304-321	Ovaj rad
	EA_omp35_2R	ATGAAGTTATCGGTGTAGTT	R		411-431					
<i>omp36</i>	EA_omp36_1F	CGAAGATCAGACCAACAA	F		75	540-558				
	EA_omp36_2R	TCATAAGTCACGGAGGT	R			597-614				
<i>acrA</i>	EA_acrA2_F	GGTATTGTCACGCTCAA	F		107	121-138				
	EA_acrA1_R	ATAATGCCACTTACCTGAG	R			208-227				
<i>rpoB</i>	EA_rpoB_2F	CTGAAGGTCCGAACATC	F		137	1691-1708				
	EA_rpoB_2R	GATAGCAGACAGGTAATGA	R			1808-1827				

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

Ref. - referenca

**Tablica 6.** Početnice korištene u tipizaciji plazmida PBRT metodom.

Replikon	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Ta (°C)	Veličina ampikona (pb)	Ref.
HI1	HI1f	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	60	471	(101)
	HI1r	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI2	HI2f	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC		644	
	HI2r	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I1-Iy	I1f	CGAAAGCCGGACGGCAGAA		139	
	I1r	TCGTCTGTTCCGCCAAGTTCGT			
X	Xf	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT		376	
	Xr	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTAGC			
L/M	L/Mf	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG		785	
	L/Mr	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N	Nf	GTCTAACGAGCTTACCGAAG		559	
	Nr	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA	FIAf	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG		462	
	FIAr	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB	FIBf	GGAGTTCGACACACGATTTCTG		702	
	FIBr	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W	Wf	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG		242	
	Wr	GGTGCGCGGCATAGAACCCT			
Y	Yf	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG		765	
	Yr	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			
P	Pf	CTATGGCCCTGCAAACGCGCAGAAA	534		
	Pr	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC	FICf	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262		
	FICr	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C	A/Cf	GAGAACCAAAGACAAGACCTGGA	465		
	A/Cr	ACGACAAACCTGAATTGCCCTCTT			
T	Tf	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750		
	Tr	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
FIIs	FIIsf	CTGTCTGAAGCTGATGGC	270		
	FIIsr	CTCTGCCACAAACTTCAGC			
F <sub>repB</sub>	FrepBf	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270		
	FrepBr	GAAGATCAGTCACACCATCC			
K	K/Bf	GCGGTCCGAAAAGCCAGAAAAC	160		
	Kr	TCTTTCACGAGCCCCGCCAAA			
B/O	K/Bf	GCGGTCCGAAAAGCCAGAAAAC	159		
	B/Or	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			
ColE	oricolEf	GTTCGTGCATACAGTCCA	186		
	oricolEr	GGCGAAACCCGACAGGACT			
ColE <sub>TP</sub>	oricolEf	GTTCGTGCATACAGTCCA	105		
	oricolETpr	GGTTTACCGGTGTCTATCC			
R	IncRf	TCGCTTCATTCTGCTTCAGC	250		
	IncRr	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA			
U	IncUf	TCACGACACAAGCGCAAGGG	842		
	IncUr	TCATGGTACATCTGGGCGC			
L/M (OXA-48)	RepA-A	GACATTGAGTCAGTAGAAGG	55	925	(123)
	RepA-B	CGTGCAGTTCGTCTTTCCGGC			
	TraU-A	ATCTCACGCAATCTTACGTC			
	TraU-B	TCGCGTCATGCGTGATCTTC			
	ParA-A	GCAGTGAAAACGTTGATCAG			
ParA-B	GATCGCAATGCGTCTTGGTG	532			

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

Ref. - referenca



### 3.1.9. PUFERI I OTOPINE

- 20 X SSC (3 M NaCl, 0,3 M natrijev citrat, pH 7,2)
- 10 X TAE (40 mM Tris-baza, 1% v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0)
- 5 X TBE (45 mM Tris-baza, 450 mM borna kiselina, 10 mM EDTA, pH 8.0)
- 10 X TE (100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0)
- Pufer za suspenziju bakterijskih stanica (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8.0)
- Pufer za lizu bakterijskih stanica (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% m/v lauroil sarkozin)
- Neutralizacijski pufer (1 M Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.4)
- Depurinacijska otopina (0,25 M HCl)
- Denaturacijska otopina (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)
- Fiziološka otopina (0,9% m/v NaCl)

### 3.1.10. POTROŠNI MATERIJAL

- Filtar papir („Whatman<sup>®</sup> chromatography paper grade 3mm 20x20cm“, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Nitrocelulozni filter s porama veličine 0,45µm (Sigma Aldrich, Republika Irska)
- Plastične kivete za UV-VIS spektrofotometriju („Uvette<sup>®</sup>“, Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Polipropilenska epruveta za centrifugu volumena 50 mL (Corning, SAD)
- Polipropilenske tubice od 100 µL u nizu od 8 tubica („MicroAmp<sup>®</sup> Fast 8-Tube Strip“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenske tubice od 200 µL (Corning, SAD)
- Polipropilenske tubice od 200 µL u nizu od 8 tubica („MicroAmp<sup>®</sup> 8 Strip Reaction Tubes“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenski optički poklopci u nizu od 8 („MicroAmp<sup>®</sup> Optical 8 cap Strips“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenski poklopci u nizu od 8 („MicroAmp<sup>®</sup> 8 cap Strips“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polistirenska tubica za centrifugu 1,5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Polistirenska tubica za centrifugu 2 mL (Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Pozitivno nabijena najlonska membrana („Nylon membrane positively charged“, Roche, Švicarska)

### 3.1.11. UREĐAJI

- Denzimati „DEN-1B“ (Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- DNA-sekvencer „ABI Prism<sup>®</sup> 310“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Hibridizator („Hybrigene hybridization oven“, Techne<sup>®</sup>, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kadica za horizontalnu elektroforezu („Sub-Cell<sup>®</sup> Model 96 cell“, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Napajanje za horizontalnu elektroforezu („Powerpac<sup>™</sup> Basic“, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Spektrofotometar za UV-VIS spektrofotometriju („Biophotometer<sup>®</sup>“, Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Termo mikser („Thermomixer Comfort“, Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Uređaj za centrifugu „Eppendorf Centrifuge 5417 R“ (Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Uređaj za centrifugu „Eppendorf Centrifuge 5430“ (Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
- Uređaj za dobivanje ultra čiste vode klase 1 („Simplicity<sup>®</sup>“, Milipore, SAD)
- Uređaj za gel elektroforezu u izmjeničnom električnom polju CHEF-DR<sup>®</sup> III (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „Veriti<sup>™</sup> Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu „StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Uređaj za suhu sterilizaciju (INKO, Republika Hrvatska)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV- svjetlošću „Genebox“ (Syngene, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV- svjetlošću OmniDOC (Clever Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Vodena kupelj bez tresilice (Bagnomaria, Italija)
- Vodena kupelj s tresilicom (Thermo Forma, SAD)

### **3.2. BAKTERIJSKI IZOLATI UKLJUČENI U STUDIJU**

Istraživanje je provedeno na 250 izolata enterobakterija prikupljenih tijekom 2011. i 2012. godine na području Republike Hrvatske koji su zadovoljavali kriterij smanjene osjetljivosti na karbapeneme. Izolati su prikupljeni kroz redovito djelovanje Nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike pri Odboru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH). U Nacionalni program za praćenje rezistencije na antibiotike uključeno je 40 kliničkih mikrobioloških laboratorija diljem Republike Hrvatske čime je pokriveno više od 90% populacije. Svi suspektne izolati enterobakterija smanjene osjetljivosti na ertapenem, utvrđene disk difuzijom prema smjernicama EUCAST-a, testiraju se u Referentnom centru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Suspektne izolati enterobakterija dostavljeni su u dubokom agaru u mikrobiološki laboratorij Zavoda za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, gdje je ponovljenim testiranjem potvrđen fenotip smanjene osjetljivost na karbapeneme. Smanjena osjetljivost enterobakterija na karbapeneme definirana je prema smjernicama EUCAST-a u slučajevima kad minimalna inhibitorna koncentracija za ertapenem iznosi više od 0,5 mg/L, odnosno više od 2 mg/L kod imipenema i meropenema (67). Identifikacija bakterijske vrste svakog izolata provedena je standardnim biokemijskim testovima i uređajem za automatiziranu identifikaciju „Vitek2 compact system” (BioMerieux, Francuska).

### **3.3. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA NA ANTIBIOTIKE**

Osjetljivost svih izolata uključenih u studiju određena je disk-difuzijskom metodom po Kirby-Baueru za sljedeće antibiotike: amoksisilin (20 µg), amoksisilin/klavulanska kiselina (20/10 µg), cefaleksin (30 µg), cefuroksim (30 µg), ceftriakson (30 µg), ceftazidim (10 µg), cefepim (30 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacilin/tazobaktam (30/6 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg) i ciprofloksacin (5 µg) (Mast Group, Ujedinjeno Kraljevstvo). Osjetljivost na antibiotike testirana je na Mueller-Hinton agaru (MH agar) („Mueller Hinton Medium“, Becton Dickinson, Njemačka). Iz nekoliko kolonija s prekončne kulture, uzgojene inkubacijom pri 37 °C na krvnom agaru (5% konjska krv, „Blood agar base“, BioRad, SAD), napravljene su suspenzije bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarlanda (1 McF, ~10<sup>8</sup> CFU/mL). Bakterijska

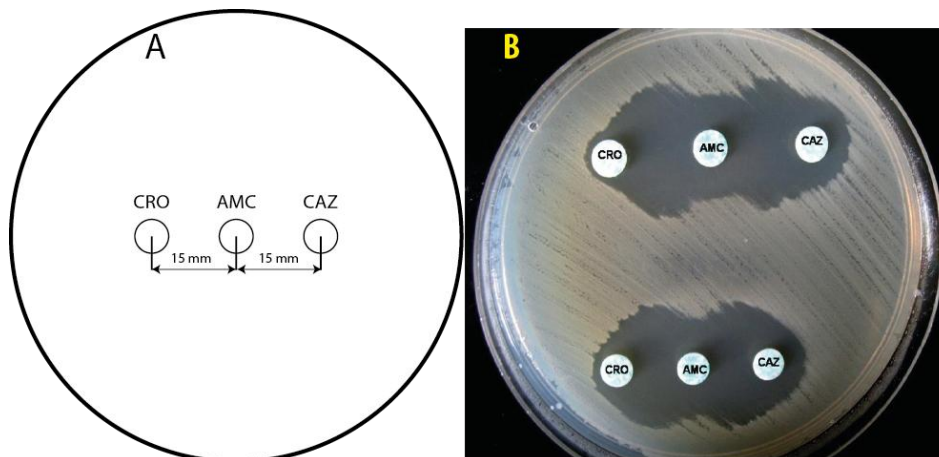
suspenzija je ravnomjerno nasadena na MH agar vatenim štapićem nakon čega su nanoseni diskovi koji sadržavaju definiranu količinu pojedinog antibiotika. Rezultati testiranja osjetljivosti na antibiotike disk-difuzijskom metodom očitani su sljedeći dan, nakon inkubacije na 37°C, mjerenjem promjera inhibicijskih zona oko diskova. Rezultati su interpretirani prema EUCAST-ovim smjernicama (67).

Osjetljivost svih izolata na karbapeneme dodatno je testirana određivanjem MIK vrijednosti za ertapenem, imipenem i meropenem koristeći Epsilometarski test (E-test) („E-TEST<sup>®</sup>“, Biomerieux, Francuska). U svrhu određivanja MIK vrijednosti E-testom bakterijska suspenzija, koja je napravljena na isti način kao i za izradu disk-difuzijskog testa, nasadena je na MH agar nakon čega je nanosena traka E-testa s koncentracijskim gradijentom antibiotika. Nakon inkubacije preko noći na 37°C očitani su rezultati testa te su interpretirani prema EUCAST-ovim smjernicama (67).

### 3.4. FENOTIPSKA DETEKCIJA PROIZVODNJE BETA-LAKTAMAZA

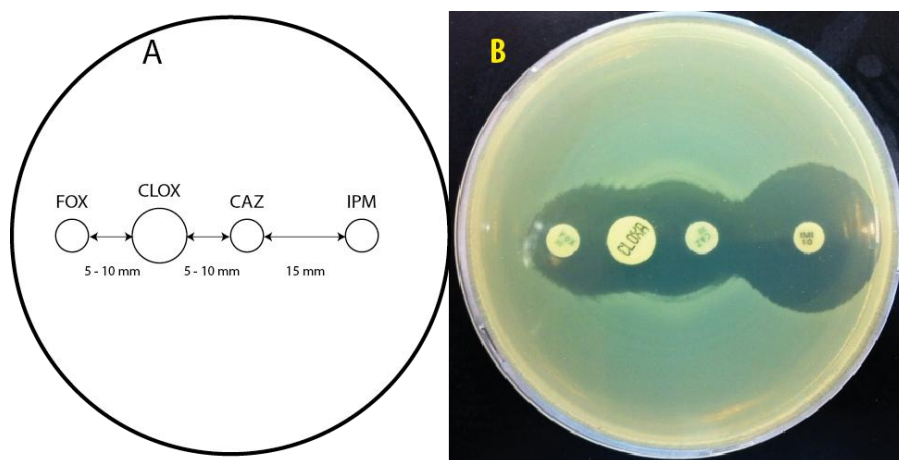
Fenotipska detekcija proizvodnje beta-laktamaza proširenog spektra, karbapenemaza iz Amblerove klase A beta-laktamaza, karbapenemaza iz klase B beta-laktamaza i plazmidnih beta-laktamaza iz klase C (AmpC) provedena je kod svih izolata. Za detekciju svih navedenih beta-laktamaza korišten je test sinergizma dva diska na MH agaru, na koji je ravnomjerno inokulirana bakterijska suspenzija u fiziološkoj otopini optičke gustoće 0,5 McF (poglavlje 3.3.).

U fenotipskoj detekciji ESBL enzima korišteni su diskovi s amoksicilinom i klavulanskom kiselinom (10 µg/10 µg), ceftazidimom (30 µg) i ceftriaksonom (30 µg) koji su postavljeni na inokulirani MH agar s dodatkom kloksacilina (250 µg/L) prema definiranom rasporedu (Slika 10.). Nakon inkubacije na 37°C preko noći, test je očitao i proglašen pozitivnim ukoliko je došlo do proširenja zone inhibicije bakterijskog rasta oko bilo kojeg diska sa cefalosporinom u smjeru diska s amoksicilinom i klavulanskom kiselinom (Slika 10.) (124, 125).



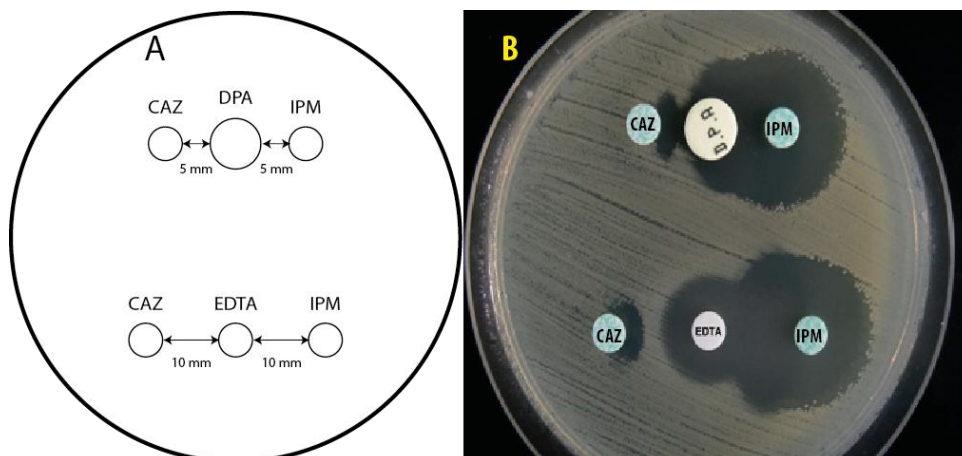
**Slika 10.** (A) Shematski prikaz rasporeda diskova s ceftriaksonom (CRO), amoksiklavom (AMC) i ceftazidimom (CAZ) u testu sinergizma dva diska za detekciju proizvodnje beta-laktamaza proširenog spektra. (B) Pozitivan rezultat testa u izolata koji proizvodi beta-laktamazu proširenog spektra.

U fenotipskoj detekciji beta-laktamaza AmpC korišteni su diskovi s cefoksitinom (30 µg), kloksacilinom (500 µg), ceftazidimom (30 µg) i imipenemom (10 µg). Diskovi su postavljeni na inokulirani MH agar prema shemi prikazanoj na slici 11. Nakon inkubacije na 37°C preko noći, očitavala se prisutnost sinergizma između diskova s kloksacilinom i cefoksitinom i/ili diskova s kloksacilinom i ceftazidimom. Najmanji znak sinergizma s kloksacilinom se očitava kao pozitivan (Slika 11.). Disk s imipenemom upućuje na prisutnost inducibilne beta-laktamaze AmpC ukoliko se zona inhibicije u smjeru ceftazidima poprimi oblik slova D (125).



**Slika 11.** (A) Shematski prikaz rasporeda diskova s cefoksitinom (FOX), kloksacilinom (CLOX), ceftazidimom (CAZ) i imipenemom (IPM) u testu sinergizma dva diska za detekciju proizvodnje beta-laktamaza AmpC. (B) Pozitivan rezultat testa u izolata koji proizvodi neinducibilnu AmpC.

U fenotipskoj detekciji i identifikaciji karbapenemaza Amblerove klase B korišten je test sinergizma dva diska na inokuliranom MH agaru, na koji su postavljaju diskovi u dva reda prema shemi prikazanoj na slici 12. U prvi red postavlja se, jedan za drugim, disk s ceftazidimom (30 µg), komercijalni disk s dipikoloničnom kiselinom (Rosco Diagnostica, Danska), te disk s imipenemom (10 µg). U drugi red postavlja se disk s ceftazidimom (30 µg), prazan disk i disk s imipenemom (10 µg). Na prazan disk nakapava se 10 µL 0,5 M EDTA. Nakon inkubacije MH ploča na 37°C preko noći očitava se sinergizam između diskova. Najmanji znak sinergizma, tj. proširenja zone inhibicije u smjeru diska s dipikoloničnom kiselinom ili EDTA smatra se pozitivnim (Slika 12.) (126, 127).



**Slika 12.** (A) Shematski prikaz rasporeda diskova s ceftazidimom (CAZ), imipenemom (IPM), EDTA i dipikoloničnom kiselinom (DPA) u testu sinergizma dva diska za detekciju proizvodnje karbapenem hidrolizirajućih metalo-beta-laktamaza. (B) Pozitivan rezultat testa u izolata koji proizvodi karbapenem-hidrolizirajuću metalo-beta-laktamazu.

U fenotipskoj detekciji i identifikaciji beta-laktamaze KPC Amblerove klase A korišteni su diskovi s boroničnom kiselinom (Rosco Diagnostica, Danska), ertapenemom (10 µg), imipenemom (10 µg) i meropenemom (10 µg) koji se postavljaju prema definiranom rasporedu (Slika 13.). Nakon inkubacije na 37°C preko noći, očitavaju se rezultati. Ukoliko postoji i najmanji znak sinergizma, odnosno proširenja zone inhibicije bilo kojeg od antibiotika u smjeru diska s boroničnom kiselinom, test se smatra pozitivnim (Slika 13.) (128).



**Slika 13.** (A) Shematski prikaz rasporeda diskova s meropenemom (MEM), ertapenemom (ETP), imipenemom (IPM) i boroničnom kiselinom (BORON) u testu sinergizma dva diska za detekciju proizvodnje karbapenemaze KPC. (B) Pozitivan rezultat testa u izolata koji proizvodi karbapenemazu KPC.

### 3.5. DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE

#### 3.5.1. IZOLACIJA UKUPNE BAKTERIJSKE DNA

Izolacija ukupne bakterijske DNA svih kliničkih bakterijskih izolata i transkonjugata *E. coli* A15R provedena je koristeći komplet reagensija za izolaciju DNA „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Biološki materijal koji se koristio za izolaciju ukupne DNA prikupljen je jednokratnom ezom iz jedne bakterijske kolonije s prekonoćne kulture uzgojene na krvnom agaru, u količini koja odgovara polovici otvora eze. Postupak izolacije DNA ovim kompletom reagensija se bazira na upotrebi kolonice od silicijevog dioksida. To je platforma za izolaciju DNA na kojoj se, na temelju velikog afiniteta vezanja DNA, omogućuje brza i efikasna separacija DNA od ostalih staničnih komponenti korištenjem priloženih reagensa koja imaju selektivna elucijska svojstva. DNA se naposljetku eluira u 150  $\mu$ L pufera za eluciju i pohranu DNA. Čistoća i koncentracija izolirane DNA provjerena je spektrofotometrijski („Biophotometer<sup>®</sup>“, Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka) mjerenjem apsorpcije na 260 i 280 nm u plastičnim UV-VIS kivetama („Uvette<sup>®</sup>“, Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka). Omjer  $A_{260}/A_{280}$  za dovoljno čistu DNA iznosi 1,6 – 1,8, dok apsorpcijska vrijednost  $A_{260} = 1$  odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50  $\mu$ g/mL.

#### 3.5.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)

Lančana reakcija polimerazom korištena je u svrhu detekcije prisutnosti gena za rezistenciju na antibiotike i u sklopu ostalih molekularno-bioloških metoda koje to zahtijevaju. Kod svih izolata koji su uključeni u ovu studiju izvršena je detekcija gena koji kodiraju karbapenemaze iz klase A beta-laktamaza ( $bla_{KPC}$ ), klase B beta-laktamaza ( $bla_{VIM}$ ,  $bla_{NDM}$  i  $bla_{IMP}$ ), te klase D beta-laktamaza ( $bla_{OXA-48}$ ). Lančanom reakcijom polimerazom izvršena je detekcija gena za rezistenciju na sljedeće klase antibiotika: (a) beta laktamski antibiotici: beta laktamaze klase A ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{VEB}$ ,  $bla_{GES}$ ,  $bla_{PER}$ ,  $bla_{SME}$ ) i plazmidne AmpC-beta laktamaze iz klase C ( $bla_{MOX}$ ,  $bla_{CIT}$ ,  $bla_{DHA}$ ,  $bla_{ACC}$ ,  $bla_{EBC}$  i  $bla_{FOX}$ ) (b) plazmidni geni za rezistenciju na kinolone:  $qnrA$ ,  $qnrB$ ,  $qnrS$ ; (c) aminoglikozid-modificirajuće enzime i ribosomske metilaze:  $aadA1/2$ ,  $aadA5$ ,  $aac(3')-I$ ,  $aac(3')-II$ ,  $aac(3')-III$ ,  $aac(3')-IV$ ,  $aph(3')-Ia$ ,  $aph(3')-II$ ,  $ant(2'')$ ,  $armA$ ,  $rmtA$ ,  $rmtB$ ,  $rmtC$ ,  $rmtD$ ,  $npmA$  i  $aac(6')-Ib$ ; (d) tetraciklinske efluks pumpe:  $tet(A)-tet(E)$ ; (e) membranski prenositelji kloramfenikola:



*cmlA*, *floR* i (f) plazmidne dihidropteroat sintaze: *sul1* i *sul2*. Početnice korištene za detekciju navedenih gena prikazane su u tablicama 1 i 2.

Sve lančane reakcije polimerazom koje su korištene u svrhu detekcije gena za rezistenciju provedene su u volumenu od 10 µL neovisno o tome jesu li sadržavale jedan (tzv. „singleplex reakcija“) ili više parova početnica (tzv. „multiplex reakcija“). Volumen reakcijske smjese iznosio je 9 µL dok je volumen izolirane genomske DNA koji je korišten kao kalup iznosio 1 µL. Sastav reakcijske smjese bio je: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka), 1X PCR buffer (50mM KCl) („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka), 0,2 mM svakog deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp<sup>®</sup> dNTP blend“, Thermo Fisher Scientific, SAD), početnice u koncentraciji 200 nM (svaka) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 0,05 U HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka).

Uvjeti lančanih reakcija polimerazom bili su sljedeći: Početna denaturacija kalupa DNA i termalna aktivacija HotStart Taq-polimeraze na 94°C u trajanju od 2:30 minuta. Faza amplifikacije PCR produkta trajala je 30 ciklusa i sastojala se od 3 segmenta: (a) denaturacija DNA kalupa pri 94°C u trajanju od 20 sekundi, (b) sparivanje početnica i denaturiranog kalupa DNA (tzv. „annealing“) pri temperaturi koju definira temperatura taljenja početnica u trajanju od 25 sekundi i (c) elongacijski segment na 72°C pri kojem dolazi do sinteze komplementarnog lanca DNA i čije je trajanje definirano veličinom PCR produkta. Nakon amplifikacijske faze slijedi faza završne elongacije na 72°C u trajanju od dvije minute, nakon čega slijedi hlađenje reakcije na 4°C. Temperatura taljenja (eng. „melting temperature“, T<sub>m</sub>) početnica definirana je njihovom veličinom (brojem nukleotida) i sastavom. Pri evaluaciji T<sub>m</sub>-a početnica korišten je besplatni program „Beacon Designer“ na mrežnim stranicama PremierBiosoft ([www.premierbiosoft.com](http://www.premierbiosoft.com)) koristeći sljedeće parametre: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl pri koncentraciji početnica od 200 nM. Temperatura sparivanja početnica s kalupom (tzv. „annealing temperature“, T<sub>a</sub>) bila je 3-5°C niža od T<sub>m</sub>-a početnica. Veličina PCR produkta je također definirana korištenim početnicama, pa je prilikom izračuna veličine amplikona korišten program „Primer Blast“ na mrežnim stranicama „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Prema pravilu da Taq-polimeraza sintetizira DNA lanac brzinom od 1000 nukleotida po minuti, trajanje elongacijske faze definirano je formulom [vrijeme = (veličina PCR produkta/ 1000 pb) \* 60s]. Sve lančane reakcije polimerazom provedene su koristeći „Veriti<sup>™</sup> Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

PCR produkti detektirani su horizontalnom elektroforezom u 1,5 %-tnom agaroznom gelu („Agarose“, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljenom u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-baza, 1% v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) s 0,1 % volumnim udjelom interkalacijske boje („Sybr<sup>®</sup> Safe“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Korišten je „Sub-Cell<sup>®</sup> Model 96 cell“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) sustav za horizontalnu elektroforezu i izvor napajanja „PowerPac<sup>™</sup> Basic power supply“ (Bio-Rad Laboratories, SAD). Elektroforeza PCR produkata izvedena je prema sljedećim parametrima: 4V/cm u trajanju od 60 minuta u 1 X TAE puferu. Za detekciju je korišteno 10 µL PCR reakcije pomiješane sa 2 µL 6 X pufera za nanošenje uzoraka (0,25% m/v bromfenol-plava, 0,25% m/v ksilen-cijanolo, 30% v/v glicerol) dok je za provjeru veličine fragmenata DNA korišten standard molekulskih masa („GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD). PCR produkti vizualizirani su UV-svjetlošću koristeći sustav za digitalnu fotografiju „OmniDOC“ (Clever Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo).

### 3.5.3. ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA

Određivanje slijeda nukleotida korišteno je za analizu gena koji kodiraju karbapenemaze i ostale beta-laktamaze nakon što im je prisutnost detektirana u izolatima koristeći lančanu reakciju polimerazom. Početnice korištene za amplifikaciju gena koji kodiraju beta-laktamaze i određivanje slijeda nukleotida prikazane su u tablici 3. Geni koji kodiraju navedene enzime umnoženi su PCR-om, nakon čega je prisutnost PCR produkta provjerena gel elektroforezom i vizualizacijom gela kao što je opisano u poglavlju 3.5.2. Amplifikacijske reakcije provedene su volumenu od 20 µL od čega je volumen reakcijske smjese iznosio 18 µL dok je volumen izolirane ukupne bakterijske DNA iznosio 2 µL. Lančana reakcija polimerazom trajala je 35 ciklusa i provedena je prema uvjetima i postavkama opisanim u poglavlju 3.5.2.

U svrhu daljnje analize, umnoženi DNA produkti sintetizirani PCR-om pročišćeni su „Exo-Sap“ metodom koristeći smjesu enzima egzonukleaze I (eng. „Exonuclease I“, Exo) i alkalne fosfataze škampa (eng. „Shrimp Alkaline Phosphatase“, SaP). Pročišćavanje je provedeno u reakcijama ukupnog volumena 3,75 µL koje su sadržavale 1 U alkalne fosfataze škampa („FastAP<sup>™</sup>“, Thermo Fisher Scientific, SAD), 5 U egzonukleaze I („Exonuclease I“, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 2,5 µL PCR produkta. Enzimska reakcija pročišćavanja PCR produkta provedena je koristeći „Veriti<sup>™</sup> Thermal Cycler“ prema sljedećem termalnom profilu: enzimska razgradnja na 37 °C u trajanju od 20 minuta i inaktivacija enzima na 80 °C u

trajanju od 15 minuta, nakon čega slijedi hlađenje reakcije na 4 °C. Po završetku, reakcija se razrjeđuje dodatkom 15 µL sterilne ultra-čiste vode („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka).

Reakcija sekvenciranja provodi se početnicama specifičnim za pojedine gene od interesa koristeći komplet reagencija „ABI PRISM BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Sve reakcije sekvenciranja, u ukupnom volumenu od 3 µL, sadržavale su početnicu koncentracije 1,6 pM, 0,6 µL „BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Ready Reaction Mix“, 0,3 µL „5X Sequencing Buffer“ i 1 µL pročišćenog PCR produkta. Sve reakcije sekvenciranja provedene su koristeći „Veriti<sup>™</sup> Thermal Cycler“ prema termalnom profilu navedenom u uputstvima proizvođača: početna denaturacija DNA kalupa pri 96 °C u trajanju od jedne minute, faza sinteze DNA lanca s ugrađenim obilježenim dideoksinukleotidima u trajanju od 25 ciklusa koja se sastoji od: (a) denaturacija DNA kalupa na 96 °C u trajanju od 10 sekundi, (b) „annealing“ na 50 °C u trajanju od 5 sekundi i (c) faza elongacije na 60 °C u trajanju od 4 minute. Naposljetku, reakcija se završava hlađenjem na 4 °C.

Po završetku, reakcije su pročišćene u svrhu daljnje analize koristeći metodu precipitacije etanolom, natrijevim acetatom i EDTA. Svakoj reakciji dodano je 9,3 µL otopine koja sadržava 0,3 µL 125 mM EDTA, 0,3 µL 3M natrijevog acetata i 8,7 µL 96%-tnog etanola. Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, reakcije su centrifugirane na 2000 x g u trajanju 35 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega je odliven supernatant. Reakcije su dodatno isprane dodavanjem 15 µL 70% etanola nakon čega je slijedilo centrifugiranje na 1650 x g u trajanju od 15 minuta. Supernatant je odbačen, a produkt reakcije sekvenciranja je otopljen u 20 µL deioniziranog formamida („Hi-Di<sup>™</sup> Formamide“, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Analiza slijeda nukleotida ispitivanih gena provedena je koristeći uređaj „ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputstvima proizvođača, iz 10 µL pročišćenog produkta otopljenog u deioniziranom formamidu. Cjelovite DNA sekvence analiziranih gena iz fragmenata dobivenih sekvenciranjem sastavljene su koristeći računalni program „DNA Baser“ (Heracle BioSoft S.R.L., Rumunjska). Varijante analiziranih gena identificirane su na temelju DNA sekvenci pomoću opcije za identifikaciju gena rezistencije u sklopu baze podataka na mrežnim stranicama instituta Pasteur koja je primarno namijenjena za MLST analizu *K. pneumoniae* (<http://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

### **3.6. MJERENJE EKSPRESIJE GENA KOJI KODIRAJU EFLUKS PUMPE I PORINSKE KANALE**

#### **3.6.1. IZOLACIJA UKUPNE BAKTERIJSKE RNA**

Bakterijskim stanicama jedne kolonije iz bakterijske kulture uzgojene na krvnom agaru inokulirano je 5 mL neselektivnog LB medija (eng „Luria-Bertani broth“, LB; 10 g/L Bakto-tripton, 5g/L ekstrakt kvasca, 10g/L NaCl, pH 7,5) i kultura je uzgajana preko noći na 37°C, uz trešnju od 50 rpm. 100 µL prekonoćne bakterijske kulture inokulirano je u 5 mL svježeg neselektivnog LB medija u kojem je kultura zatim uzgajana do eksponencijalne faze rasta (OD<sub>600</sub> ~0,6) na 37°C, uz trešnju od 50 rpm. Ukupna bakterijska RNA izolirana je iz bakterijskih stanica prikupljenih centrifugiranjem 4 mL bakterijske kulture na 10000 x g u trajanju od 5 minuta. Nakon odbacivanja supernatanta, bakterijske stanice u talogu su resuspendirane u 1 mL „TriPure“ reagensa (Roche, Švicarska) namijenjenog za lizu stanica i izolaciju DNA, RNA i proteina. Daljnja izolacija ukupne bakterijske RNA provedena je prema uputstvima proizvođača, uz određene modifikacije.

Bakterijske stanice resuspendirane u „TriPure“ reagensu inkubirane su na 65°C u trajanju od 10 minuta uz trešnju od 1400 rpm. Po završetku inkubacije, suspenzija je ohlađena na sobnu temperaturu, dodano je 200 µL kloroforma (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska) nakon čega je uslijedilo vorteksiranje u trajanju od 15 sekundi i inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta uz trešnju od 1000 rpm. Bakterijski lizat je potom centrifugiran na 12000 x g u trajanju od 15 minuta pri 4°C. 450 µL vodene faze dobivene centrifugiranjem otpipetirano je u drugu polistirensku tubicu za mikrocentrifugiranje volumena 1,5 mL. Vodena faza je pomiješana s 500 µL izopropanola (CLARO-PROM d.o.o., Republika Hrvatska) i promiješana višekratnom inverzijom, nakon čega je uslijedila precipitacija RNA inkubacijom na -20°C u trajanju od 24 sata. Precipitirana RNA je istaložena centrifugiranjem na 15000 x g u trajanju od 20 minuta pri 4°C. Supernatant je izliven, talog ispran u dva navrata sa 75%-tnim etanolom i centrifugiranjem na 15000 x g u trajanju od 15 minuta pri 4°C, nakon kojih je slijedilo odbacivanje supernatanta. Nakon zadnjeg ispiranja, etanol je dodatno uklonjen pipetom, a talog RNA je ostavljen da se suši na sobnoj temperaturi u trajanju od pola sata pod strujanjem zraka u laminaru za izolaciju RNA. Osušeni talog RNA otopljen je u 65 µL sterilne ultra-čiste vode tretirane dietil-pirokarbonatom („Ambion® DEPC-Treated Water“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Otopljena RNA je inkubirana na 60°C u trajanju od 10 minuta kako bi se pospješilo otapanje RNA. Alikvot od 50 µL otopljene RNA je pohranjen na -80°C do daljnje upotrebe, dok je

ostalnih 15  $\mu\text{L}$  korišteno za mjerenje koncentracije i čistoće izolirane RNA u plastičnim kivetama namijenjenim za UV/VIS spektrofotometriju mjerenjem apsorbancije na 260 i 280 nm. Omjer  $A_{260}/A_{280}$  upućuje na kontaminaciju RNA proteinskim komponentama i za dovoljno čistu RNA iznosi 1,8 – 2,1, dok omjer  $A_{260}/A_{230}$  upućuje na kontaminaciju fenolnim spojevima, gvanidin-izotiocijanatom i solima iz reagensa i za dovoljno čistu RNA kreće se u rangu iznad 1,8.

Kako bi se iz izolirane RNA uklonila DNA u tragovima, RNA svakog uzorka je tretirana DNazom u ukupnom reakcijskom volumenu od 25  $\mu\text{L}$  koji sadrži 5  $\mu\text{g}$  RNA, 1U DNaze („Turbo™ DNase“, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 1X reakcijski pufer („TURBO™ DNase Buffer“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Razgradnja DNA u RNA uzorku provedena je inkubacijom na 37°C u trajanju od 30 minuta koristeći „Veriti™ Thermal Cycler“. Po završetku razgradnje, u svaki RNA uzorak je dodana EDTA u konačnoj koncentraciji od 5 mM, a DNaza je inaktivirana inkubacijom RNA uzorka na 75°C u trajanju od 10 minuta koristeći „Veriti™ Thermal Cycler“.

### 3.6.2. OBRNUTO PREPISIVANJE RNA (REVERZNA TRANSKRIPCIIJA)

Obrnuto prepisivanje RNA (eng. „reverse transcription“, tzv. „reverzna transkripcija“) korišteno je kako bi se sintetizirala jednolančana komplementarna DNA (eng. „complementary DNA, cDNA) koja se koristi kao kalup u daljnjoj analizi ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. „quantitative real-time PCR“, qRT-PCR). U reverznoj transkripciji korištene su početnice dužine 6 nukleotida nasumičnog slijeda, čime se u cDNA prepisuje ukupna RNA uzorka, a ne samo jedan specifični gen. Reverzna transkripcija provedena je u reakcijama ukupnog volumena 12,5  $\mu\text{L}$  i sadržavala je 1  $\mu\text{g}$  RNA, 500 ng nasumičnih heksamernih početnica („Random Primers“, Promega, SAD), po 0,5 mM svakog deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp® dNTP blend“ blend, Thermo Fisher Scientific, SAD), 12 U inhibitora RNaze („RNasin® Inhibitor“, Promega, SAD), 1X „M-MLV RT“ pufer (Promega, SAD) i 100 U M-MLV reverzne transkriptaze („Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“, Promega, SAD). Obrnuto prepisivanje RNA provedeno je inkubacijom na 37°C u trajanju od sat vremena koristeći „Veriti™ Thermal Cycler“. Po završetku inkubacije, cDNA razrijeđena je sa sterilnom ultra-čistom vodom u omjeru 1:3, do konačnog volumena od 40  $\mu\text{L}$ .

### 3.6.3. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu analizirana je ekspresija gena koji kodiraju transmembranske porinske kanale i efluks pumpe u kliničkih izolata *K. pneumoniae*, *E. cloacae* i *E. aerogenes*. Korištena je metoda relativne analize ekspresije gena u kojoj je ekspresija gena u izolata navedenih vrsta uspoređena s ekspresijom odgovarajućih gena u kontrolnim skupinama. Kontrolne skupine sačinjene su od izolata divljeg tipa koji, uz intrinzičku rezistenciju na neke antibiotike, nisu manifestirali rezistentan fenotip na karbapeneme i ostale klase antibiotika.

U izolatima navedenih vrsta analizirana je ekspresija gena jedne, najznačajnije, efluks pumpe i dva gena koji kodiraju najznačajnije porinske kanale. U vrste *K. pneumoniae* analizirana je ekspresija gena koji kodira *acrB* podjedinicu efluks pumpe *acrAB*, te gena koji kodiraju porinske kanale *ompK35* i *ompK36* koristeći početnice preuzete iz studija Hong i suradnika (39) i Landman i suradnika (120) (Tablica 5.). U vrste *E. cloacae* korištene su početnice preuzete iz studije Szabo i suradnika (121) za analizu ekspresije gena koji kodira *acrB* podjedinicu efluks pumpe *acrAB*, te gena *ompC* i *ompF* koji kodiraju istoimene porinske kanale (Tablica 5.). U vrste *E. aerogenes*, u analizi ekspresije gena koji kodira podjedinicu *acrA* efluks pumpe *acrAB* i gena *omp35* i *omp36* korištene su početnice dizajnirane u ovom radu (Tablica 7.). Ekspresija analiziranih gena normalizirana je s obzirom na ekspresiju tzv. „housekeeping“ gena *rpoB*. Ovaj gen kodira beta podjedinicu bakterijske DNA-ovisne RNA polimeraze i eksprimira se konstitutivno i uniformno u svih izolata analiziranih bakterijskih vrsta. Ekspresija gena *rpoB* mjerena je koristeći početnice navedene u studiji Hong i suradnika (39) i Szabo i suradnika (121) kod vrsta *K. pneumoniae* i *E. cloacae* dok su kod *E. aerogenes* korištene početnice dizajnirane u ovom radu (Tablica 5., Tablica 7.).

**Tablica 7.** Početnice korištene u mjerenju relativne ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu u izolata *E. aerogenes*

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5' – 3')	Smjer	Ta (°C)	Veličina amplicona (pb)
<i>omp35</i>	EA_omp35_2F	CTGAAAGCGGGTGAATA	F	55	128
	EA_omp35_2R	ATGAAAGTTATCGGTGTAGTT	R		
<i>omp36</i>	EA_omp36_1F	CGAAGATCAGACCAACAA	F		75
	EA_omp36_2R	TCATAAGTCACGGAGGT	R		
<i>acrA</i>	EA_acrA2_F	GGTATTGTCACGCTCAA	F		107
	EA_acrA1_R	ATAATGCCACTTACCTGAG	R		
<i>rpoB</i>	EA_rpoB_2F	CTGAAGGTCCGAACATC	F		137
	EA_rpoB_2R	GATAGCAGACAGGTAATGA	R		

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

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu izvedena je koristeći fluorofor „Sybr<sup>®</sup> green I“ koji se neselektivno interkalira u dvolančanu DNA. Sve reakcije provedene su u ukupnom volumenu od 10  $\mu$ L, od čega na volumen dodanog cDNA uzorka otpada 2  $\mu$ L, odnosno ekvivalent od 50 ng prepisane RNA. Svaka reakcija sadržavala je početnice za samo jedan analizirani gen. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je početnice u konačnoj koncentraciji 500 nM i 1X koncentraciju enzimske otopine „2x Quantitect<sup>®</sup> Sybr<sup>®</sup> Green“ iz kompleta reagensija „Quantitect<sup>®</sup> Sybr<sup>®</sup> Green PCR Kit“ (Qiagen, Njemačka). Razina ekspresije svih analiziranih gena pojedinog izolata, uključujući i gen *rpoB*, mjerena je paralelno, za vrijeme trajanja istog programa. Reakcije kojima je mjerena razina ekspresije svakog gena u analiziranim izolatima pripremljene su u triplikatima. Sva mjerenja razine ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu izvedene su koristeći uređaj „StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema sljedećim postavkama programa: Inicijalna denaturacija cDNA kalupa i aktivacija Taq-polimeraze pri 95<sup>°</sup>C u trajanju 15 minuta koju slijedi faza amplifikacije u trajanju od 40 ciklusa, te naposljetku disocijacijska reakcija u svrhu dobivanja krivulje taljenja PCR produkata. Svaki ciklus amplifikacije sastojao se od: (a) denaturacije na 95<sup>°</sup>C u trajanju od 15 sekundi, (b) „annealing“ pri 55<sup>°</sup>C za početnice kod izolata *K. pneumoniae* i *E.aerogenes* / 60<sup>°</sup>C za početnice kod *E. cloacae* u trajanju od 20 sekundi te (c) elongacija na 72<sup>°</sup>C u trajanju od 30 sekundi. Fluorescencija svake reakcije mjerena je na kraju svakog ciklusa amplifikacije. Disocijacijska reakcija koja je uslijedila nakon faze amplifikacije korištena je u svrhu određivanja krivulje temperature taljenja sintetiziranih DNA produkata koja se koristi kao indirektni pokazatelj specifičnosti qRT-PCR reakcije.

Očitavanjem dobivenih rezultata kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu koristeći program „StepOnePlus<sup>™</sup> Software v2.3“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) utvrđene su vrijednosti kritičnih ciklusa prelaska praga (eng. „threshold cycle“,  $C_T$ ) i očitani su temperaturni profili taljenja sintetiziranih DNA produkata. Kritični ciklus prelaska praga definiran je kao ciklus u kojem je detektirana fluorescencija prešla pozadinsku fluorescenciju i inverzno je proporcionalan logaritmu početnog broja molekula kalupa. Za analizu podataka dobivenih kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu i usporedbu razine ekspresije promatranih gena između analiziranih izolata i kontrolne skupine sačinjene od osjetljivih izolata divljeg tipa korišten je program REST 2009 (Qiagen, Njemačka).

### 3.7. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA

#### 3.7.1. GEL ELEKTROFOREZA U IZMJENIČNOM ELEKTRIČNOM POLJU

Gel elektroforezom ukupne bakterijske DNA, razgrađene restrikcijom enzimom XbaI, u izmjeničnom električnom polju analizirana je genetička srodnost svih izolata uključenih u studiju prema standardiziranom Pulsenet-ovom protokolu namijenjenom za genotipizaciju enterobakterija (129). Od pojedinih kolonija iz prekonoćnih kultura izolata uzgojenih na krvnom agaru pripremljene su suspenzije u fiziološkoj otopini optičke gustoće 4,0 McF. Jedan mililitar pripremljene suspenzije centrifugiran je 5 minuta na 7500 x g u polipropilenskoj tubici za centrifugu volumena 1,5 mL. Talog je resuspendiran u 150 µL pufera za suspenziju bakterijskih stanica (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8.0) i inkubiran 10 minuta na 55°C nakon čega je dodatno inkubiran 2 minute na 55°C uz dodatak 20 µL proteinaze K („Proteinase K“, 20 mg/mL, Qiagen, Njemačka). Ovako pripremljen bakterijski lizat pomiješan je sa 170 µL otopljene agaroze niskog tališta („Agarose Low Melting“, Eurobio, Francuska, 1,5% m/v u 1 X TE puferu, 1% m/v natrijev dodecil-sulfat) temperirane na 50°C. Nakon pažljivog miješanja agaroze niskog tališta i bakterijskog lizata pipetom, izrađeni su agarozni blokovi nanošenjem ukupnog volumena bakterijskog lizata u odgovarajući kalup („Reusable plug mold“, Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon polimerizacije agaroze hlađenjem u kalupima na 4°C u trajanju od 10 minuta, agarozni blokovi prebačeni su iz kalupa u polipropilenske epruvete za centrifugu volumena 50 mL (Corning, SAD) i inkubirani su 2 sata na 54°C u 5 mL pufera za lizu bakterijskih stanica (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% m/v lauroil sarkozin) uz dodatak 20 µL proteinaze K koristeći vodenu kupelj uz trešnju od 55 rpm. Po inkubaciji, pufer za lizu stanica je uklonjen, a agarozni blokovi su isprani 2 puta s 10 mL sterilne ultra čiste vode i 3 puta s 10 mL 1 X TE pufera (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) pripremljenim u sterilnoj ultra čistoj vodi. Svaki korak ispiranja je obuhvaćao inkubaciju od 15 minuta pri 50°C u vodenoj kupelji uz trešnju od 50 rpm. Svi reagensi korišteni u fazi ispiranja su unaprijed temperirani na 50°C. Nakon ispiranja, agarozni blokovi su pohranjeni u 5 mL 1 X TE pufera i skladišteni su u polipropilenskim epruvetama za centrifugu volumena 50 mL na 4°C do daljnje uporabe.

Od svakog agaroznog bloka odrezan je fragment specifičnih dimenzija koji je korišten u daljnjoj obradi. Nakon inkubacije agaroznog fragmenta u 100 µL 1 X Tango pufera (Thermo Fisher Scientific, SAD) u trajanju od 30 minuta pri 37°C, ukupna bakterijska DNA razgrađena je restrikcijom enzimom XbaI inkubacijom na 37°C u trajanju od 2,5 sata u 100 µL restrikcijom pufera (1 X pufer Tango, 20 U XbaI, Thermo Fisher Scientific, SAD)



priređenog u sterilnoj ultra čistoj vodi. Nakon inkubacije, razgradnja je prekinuta uklanjanjem restrikcijskog pufera i dodavanjem 100 µL 1 X TE pufera.

Agarozni blokovi i standard molekulskih masa „CHEF DNA Size Standard“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) nanaseni su na odgovarajuće pozicije na plastičnom češlju i postavljeni su u kalup za izradu gela za elektroforezu. Zatim je dodan 1 % gel za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju („Pulsed Field Certified<sup>TM</sup> Agarose“, Bio-Rad, Laboratories, SAD) otopljen u sterilnom 0,5 X TBE puferu (45 mM Tris-baza, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0) temperiranom na 55°C. Elektroforeza u izmjeničnom električnom polju izvedena je u sterilnom 0,5 X TBE puferu koristeći „CHEF-DR<sup>®</sup> III“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) sustav za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju prema programu specifičnom za pojedine bakterijske vrste.

Elektroforeza u izmjeničnom električnom polju ukupne bakterijske DNA *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* izvedena je prema programu standardiziranog Pulsenet-ovog protokola uz modifikacije preuzete iz studije Han i suradnika (130): napon 6 V/cm, kut električnog polja 120°, vrijeme pulsa 6-36 s, pri 14°C u trajanju od 19 sati. Elektroforeza u izmjeničnom električnom polju ukupne bakterijske DNA izolata *Enterobacter* spp. i *Citrobacter freundii* izvedena je po programu preuzetom iz standardiziranog Pulsenet-ovog protokola prema sljedećim parametrima: napon 6 V/cm, kut električnog polja 120°, vrijeme pulsa 2,2 – 54,2 s, pri 14°C u trajanju od 18,5 sati.

DNA je nakon elektroforeze u izmjeničnom električnom polju vizualizirana bojanjem gela inkubacijom u 300 mL vodene otopine koja sadržava 0,1 % volumnog udjela Sybr<sup>®</sup> Safe interkalacijske boje. Obojeni gelovi su snimljeni pod UV-svjetlošću koristeći uređaj „Genebox“ (Syngene, UK) sustav za digitalnu fotografiju na institutu Ruđer Bošković. Rezultati su analizirani vizualno, prema kriterijima navedenim u radu Tennover i suradnika (88) pri čemu su dva izolata svrstana u istu PFGE grupu ukoliko između makrorestrikcijskih profila njihove ukupne genomske DNA nije uočeno više od 6 razlika.

### 3.7.2. MLST

MLST je u ovom radu korišten za tipizaciju izolata *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Izolati ostalih vrsta nisu uključeni u analizu budući da se spomenuta metoda na njih ne može primijeniti jer do sada nisu razvijene standardizirane sheme tipizacije.

Ovom metodom tipiziran je po jedan reprezentativni izolat *K. pneumoniae* i *E. cloacae* svakog pulсотипа nakon što su svi izolati genotipizirani gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju. Svaki reprezentativni izolat je odabran nasumičnim odabirom. MLST je za izolate *K. pneumoniae* rađen prema protokolu iz studije Brisse i suradnika (119), dok je za izolate *E. cloacae* rađen prema protokolu iz studije Miyoshi-Akiyama i suradnika (92). MLST izolata *K. pneumoniae* obuhvaća određivanje slijeda nukleotida u genima *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* i *tonB*, dok se kod *E. cloacae* analizira slijed nukleotida u *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* i *rpoB* (Tablica 4.). Amplifikacija navedenih gena iz ukupne bakterijske DNA izolata provodi se lančanom reakcijom polimerazom. Vizualizacija PCR produkata, pročišćavanje PCR reakcije, daljnja priprema za sekvenciranje i bioinformatička obrada podataka dobivenih sekvenciranjem provode se prema protokolima navedenim u poglavljima 3.5.2 i 3.5.3. Kombinacija 7 alela analiziranih gena označava se kao jedan ST (engl. „sequence type“). Svakom klonskom predstavniku dodijeljen je pripadajući ST na osnovi kombinacije alela 7 konzerviranih (tzv. „housekeeping“) gena, usporedbom s bazom podataka na mrežnim stranicama instituta Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) za *K. pneumoniae* i „Enterobacter cloacae MLST site“ (<https://pubmlst.org/ecloacae>) za *E. cloacae*. EBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) korišten je za definiranje grupa i klonskih kompleksa analiziranih klonskih predstavnika (131).

### 3.8. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA

#### 3.8.1. KONJUGACIJA

Za analizu horizontalnog prijenosa gena koji kodiraju karbapenemaze korištena je metoda konjugacije na nitroceluloznom filteru s porama veličine 0,45  $\mu\text{m}$  (eng. „filter-mating“). Horizontalni prijenos gena analiziran je samo kod kliničkih izolata koji proizvode karbapenemaze. Kao recipijent plazmida korišten je soj *E. coli* A 15R koji ne posjeduje plazmide i rezistentan je na rifampicin i natrijev azid, dok su donori bili klinički izolati koji proizvode karbapenemaze.

Prekonočne kulture bakterija inokulirane iz jedne kolonije bakterija s krvnog agara uzgojene su u 10 mL LB medija na 37°C uz trešnju od 50 rpm. Donorski izolati uzgojeni su u selektivnom LB mediju s dodatkom 0,5 mg/L meropenema (Meropenem prašak za otopinu za injekciju ili infuziju, Sandoz®, Republika Hrvatska), dok su recipijentni sojevi uzgajani u mediju s dodatkom 256 mg/L rifampicina (Rimactan 300 mg tvrde kapsule, Pliva d.o.o., Republika Hrvatska) i 150 mg/L natrijevog azida (Sigma Aldrich, Njemačka). 50  $\mu\text{L}$  prekonočne kulture inokulirano je u neselektivni LB medij i kulture su uzgajane do eksponencijalne faze rasta ( $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ ) na 37°C uz trešnju od 50 rpm. Donori i recipijenti pomiješani su u omjeru 1:9 miješanjem 500  $\mu\text{L}$  kulture donorskog izolata s 4,5 mL kulture recipijentnog soja. 400  $\mu\text{L}$  pomiješane kulture donora i recipijenata centrifugirano je na 2000 x g u trajanju od 5 minuta, nakon čega je odbačen supernatant. Bakterijske stanice u talogu resuspendirane su u 20  $\mu\text{L}$  neselektivnog LB medija i nanesene su na gornju stranu sterilnog nitroceluloznog filtera s porama promjera 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich, Republika Irska) koji je polegnut na neselektivni LB agar (10 g/L Bakto-tripton, 5g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar, pH 7,5).

Bakterijske stanice na nitroceluloznom filteru uzgajane su 16 sati inkubacijom na 37°C, nakon čega su prikupljene s nitroceluloznog filtera vorteksiranjem filtera u 2 mL sterilne fiziološke otopine. 200  $\mu\text{L}$  serijskih razrjeđenja bakterijskih stanica od  $10^0$  do  $10^{-5}$  u sterilnoj fiziološkoj otopini nasađena su u triplikatima razmazivanjem sterilnim staklenim štapićem na selektivni LB agar koji sadrži meropenem (0,5 mg/L), rifampicin (256 mg/L) i natrijev azid (150 mg/L). Prisutnost transkonjugata na selektivnim podlogama očitana je nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24 sata.

Horizontalni transfer gena koji kodiraju karbapenemaze iz donora u recipijentni soj potvrđen je lančanom reakcijom polimerazom, a potvrda recipijentnog soja obavljena je određivanjem filogenetske skupine transkonjugata i usporedbom s filogenetskom skupinom *E.*

*coli A15R* koristeći lančanu reakciju polimerazom prema studiji Clermont i suradnika (115) (Tablica 1.). Provjera rasta recipijentnog soja provedena je nasađivanjem  $10^{-4}$  razrjeđenja na LB agar koji sadrži 256 mg/L rifampicina i 150 mg natrijevog azida, dok je provjera rasta donora provedena nasađivanjem na selektivni LB agar s 0,5 mg/L meropenema. Negativna kontrola provjerena je nasađivanjem donorskog i recipijentnog soja na podlogu za selekciju transkonjugata (132).

### 3.8.2. GEL ELEKTROFOREZA U IZMJENIČNOM POLJU NAKON RAZGRADNJE UKUPNE BAKTERIJSKE DNA S1-NUKLEAZOM

Gel elektroforeza u izmjeničnom polju nakon razgradnje ukupne bakterijske DNA S1-nukleazom (eng. „S1 Pulsed Field Gel Electrophoresis“, S1-PFGE) korištena je u svrhu određivanja veličine i broja plazmida u svim izolatima koji proizvode karbapenemaze kao i u svim transkonjugatima *E. coli A15R*. Izolati koji nisu proizvodili karbapenemaze nisu bili uključeni u analizu.

Ukupna bakterijska DNA u agaroznim blokovima čija je izrada opisana u poglavlju 3.7.1 tretirana je S1-nukleazom, enzimom koji kida jednolančanu DNA i RNA, no posjeduje sposobnost linearizacije svih superspiraliziranih plazmida. Kidanje se odvija u blago denaturiranim regijama koje nastaju zbog mehaničkog torzijskog stresa koji se javlja kao posljedica veličine molekule DNA. U isto vrijeme S1 nukleaza prikazuje vrlo ograničenu nukleaznu aktivnost spram kromosomske DNA (133).

Od svakog agaroznog bloka odrezan je fragment specifičnih dimenzija koji je korišten u daljnjoj obradi. Nakon inkubacije agaroznog fragmenta u 100  $\mu$ L 1 X reakcijskog pufera za nukleazu S1 („S1 buffer“, Thermo Fisher Scientific, SAD) u trajanju od 30 minuta pri 37°C reakcijski pufer se uklanja, a ukupna bakterijska DNA tretira se S1-nukleazom inkubacijom agaroznih fragmenata na 37°C u trajanju od sat vremena u 100  $\mu$ L restriksijskog pufera (3,5 U „S1-nuclease“, 1X reakcijski pufer za nuklezu S1; Thermo Fisher Scientific, SAD) priređenog u sterilnoj ultra čistoj vodi. Nakon inkubacije, razgradnja je prekinuta uklanjanjem restriksijskog pufera i dodavanjem 100  $\mu$ L 5 X TE pufera (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0) temperiranog na 4°C.

Daljnja priprema gela za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju provedena je kao što je opisano u poglavlju 3.7.1. S1-PFGE provedena je koristeći CHEF-DR<sup>®</sup> III sustav za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju prema programu preuzetom iz studije Sirichote i suradnika (134) prema sljedećim parametrima: napon 6 V/cm, kut električnog polja

120°, vrijeme pulsa 6,8 – 38,4 s, pri 14°C u trajanju od 19 sati. DNA je nakon elektroforeze u izmjeničnom električnom polju vizualizirana na način opisan u poglavlju 3.7.1. Veličina plazmida je određena uspoređivanjem položaja plazmida na gelu sa standardom molekulskih masa „CHEF DNA Size Standard“.

### 3.8.3. HIBRIDIZACIJA DNA METODOM PO SOUTHERN-U

Kako bi se utvrdilo na kojem se plazmidu nalazi gen koji kodira karbapenemazu provedena je hibridizacija fragmenata DNA na gelu dobivenim S1-PFGE. Netom nakon vizualizacije, S1-PFGE gel je ispran inkubacijom u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi u 250 mL deionizirane vode. Depurinacija fragmenata DNA u gelu provedena je inkubacijom na sobnoj temperaturi u 250 mL depurinacijske otopine (0,25 M HCl) u trajanju od maksimalno 15 minuta. Gel je 2 puta ispran s 250 mL deionizirane vode nakon čega je 2 puta inkubiran u 250 mL denaturacijske otopine (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku denaturacije, gel je jednokratno ispran s 250 mL deionizirane vode nakon čega je neutraliziran inkubacijom u neutralizacijskom puferu (1 M Tris, 1.5 M NaCl, pH 7,4) u dva navrata u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Fragmenti DNA sa S1-PFGE gela preneseni su na pozitivno nabijenu najlonsku membranu („Nylon membrane positively charged“, Roche, Švicarska) kapilarnim silama koje se javljaju uslijed kretanja 20 X SSC pufera (3 M NaCl, 0,3 M natrijev citrat, pH 7,2) iz spremnika s puferom kroz gel i pozitivno nabijenu najlonsku membranu u debeli sloj upijajućeg papira koji se nalazi iznad gela i najlonske membrane. Debeli sloj upijajućeg papira pritisnut je utegom mase 500 g. Na ovakav način, fragmenti DNA migriraju iz gela i vežu se za površinu pozitivno nabijene najlonske membrane preslikavajući položaj na gelu. Nakon 16-20 sati, prijenos fragmenata DNA prekinut je rastavljanjem sklopa, najlonska membrana je odvojena od gela i isprana u 5 X SSC puferu (0,75M NaCl, 75 mM natrijev citrat, pH 7,2). Fragmenti DNA na pozitivno nabijenoj membrani su imobilizirani inkubacijom membrane postavljene između dvije staklene ploče obložene papirnim ubrusima u sterilizatoru na 100°C u trajanju od 30 minuta.

Za hibridizaciju imobiliziranih fragmenata DNA na membrani sa specifičnom DNA sondom korišten je komplet reagensija „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I“ (Roche, Švicarska) prema uputama proizvođača. DNA sonde obilježene digoksinom korištene su za detekciju gena koji kodiraju karbapenemaze (Tablica 8.). Izrađene su lančanom reakcijom polimerazom s početnicama korištenim za detekciju gena koji kodiraju karbapenemaze. Hibridizacija plazmida na membrani i obilježenih DNA sondi

provedena je inkubacijom u 15 mL hibridizacijskog pufera s ~500 ng obilježene DNA sonde preko noći u hibridizatoru („Hybrigene hibridization oven“, Techne<sup>®</sup>, Ujedinjeno Kraljevstvo) na 63 °C uz kontinuirano okretanje hibridizacijskih staklenih tuba. Nakon hibridizacije, membrane su isprane i inkubirane u nizu pufera kojom je membrana pripremljena za imunodetekciju gena od interesa koristeći protutijela konjugirana s alkalnom fosfatazom koja se specifično vežu za digoksinen. Dodatkom supstrata za alkalnu fosfatazu, prisutnost gena koji kodira karbapenemazu potvrđena je pojavom plavog precipitata na membrani na poziciji koja odgovara položaju plazmida koji nosi gen za karbapenemazu od interesa.

**Tablica 8.** Digoksinenom obilježene sonde korištene za detekciju gena koji kodiraju karbapenemaze

<b>Sonda za detekciju gena <i>bla<sub>KPC</sub></i></b>		
Veličina: 793 pb	Položaj u genu: 21 - 813	Slijed nukleotida (5'-3'):
AGTTCGTGTCTTGTCTCATATGCGCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCATTCGCTA AACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTG AGGAGCGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCTT GCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAAATGCGCTGGTCCGTTGGTACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCAT GACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCGTGAATACAGTGATAACGCCCGCCCAATTTGTTGTGAAGGAGTTGGGCGG CCCGCGGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTGGACCCTGGGAGCTGGAGCTGAACCTC GCCATCCAGGCGATGCGCGGATACCTCATCGCGCGCGCGGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCA CTGGCTGCGCCGAGCGCAGCAGTTTGTGATTGGTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGGCGGTG CCGGCAGACTGGGAGTGGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAATGACTATGCCGTGCTTGGCC ACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCGGGCGCCTAACAAAGGATGACAAG		
<b>Sonda za detekciju gena <i>bla<sub>VIM</sub></i></b>		
Veličina: 442 pb	Položaj u genu: 91 - 532	Slijed nukleotida (5'-3'):
GGTAGTATCCGACAGTCAACGAAATCCGGTTCGGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTGTGGTTCGCATATCG CAACGCAGTCTGTTGATGGCGGGTCTACCCGTTCAATGGTCTCATTTGTCGATGGTGTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACA GCGTGGGGTGCAGAAAAACACAGCGCACTTCTCGCGGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCGTAACCGGTGCAAGTCTCC ACGCACTTTCATGACGACCGCGTGGCGGGCTGATGTCCTTCGGGCGGTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTTCGACAC GCCGCTAGCCGAGGAGAGGGAAACGAGATTCCACGCATTCTCTAGAAGGACTCTATCGAGCGGGGACGCAGTGCCT TCGGTCCAGTAGAGCTTCTATCCTGGTGCTG		
<b>Sonda za detekciju gena <i>bla<sub>NDM</sub></i></b>		
Veličina: 654 pb	Položaj u genu: 135 - 788	Slijed nukleotida (5'-3'):
GTTTGGCGATCTGGTTCGCGCAGCTCGCACCGAATGTCTGGCAGCACACTTCTATCTCGACATGCCGGTTTCGGGGCA GTCGCTTCCAACGGTTTGTATCGTCAGGGATGGCGGGCGGTGCTGGTGGTTCGATACCGCTGGACCGATGACCAGACCGCCC AGATCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTTCGCGTGGCGGTGGTACTCACGCGCATCAGGACAAGATGG GCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGTGGAACAGCTTGCCTCCGCAAGAGGGGA TGTTGGCGGCAACACAGCCTGACTTTCGCGCCAAATGGCTGGGTGCAACCAGCAACCGCGCCAACTTTGGCCCGCTCAA GGTATTTTACCCCGGCCCGCCACACCAAGTGAATATACCGGTTGGGATCGACGGCACCGACATCGCTTTTGGTGGCTGC CTGATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCGCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTACGCCGCGTCAGCGCGCGG TTTGGTGGCGGCTTCCCAAGGCCAGCATGATCGTATGAGCCATTCCGCCCCGATAGCCGCGCCGAATCACTCATACGG C		
<b>Sonda za detekciju gena <i>bla<sub>OXA-48</sub></i></b>		
Veličina: 744 pb	Položaj u genu: 31 - 774	Slijed nukleotida (5'-3'):
TTGGTGGCATCGATTATCGGAATGCCTGCGGTAGCAAAGGAATGGCAAGAAAACAAAAGTTGGAATGCTCACTTTACTGAA CATAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCAAGGATTTACCAATAATCTTAAACGGGCGAACCAA GCATTTTACCCGCATCTACCTTTAAAATTTCCCAATAGCTTGATCGCCCTCGATTTGGGCGTGGTTAAGGATGAACCAAGT CTTAAAGTGGGATCGACAGACGCGGATATCGCCACTTGGAAATCGCGATCATAATCTAATCACCGCGATGAAATATTCAAGT GTGCTGTTTATCAAGAATTTGCCCGCAAATTTGGCGAGGCACGTATGAGCAAGATGCTACATGCTTTTCGATTATGGTAATG AGGACATTTCCGGCAATGTAGACAGTTTCTGGCTCGACGGTGGTATTGCAATTTCCGGCCACGGAGCAAAATCAGCTTTTAAAG AAAGCTGTATCAATAAGTTACACGTATCGGAGCGCAGCCAGCGTATTGTCAAACAAGCCATGTGACCGAAGCCAAATGG TGACTATATTATTCGGGCTAAAACCTGGATATCGCCACTGAAATCGAATCAAGATTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGAACCT GATGATAATGTGTGGTTTTTTTGGCGATGAATATGGATATGCCACATCGGATGGTTTGGGCTGCGCAAGCCATCACAAAAG AAGTCTC		

#### 3.8.4. KLASIFIKACIJA PLAZMIDA PREMA SKUPINAMA INKOMPATIBILNOSTI

Tipizacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti (tzv. „Inc skupine“) provedena je kod svih kliničkih izolata koji proizvode karbapenemaze i kod svih transkonjugata *E. coli* A15R. Izolati koji nisu proizvodili karbapenemaze nisu bili uključeni u analizu. Tipizacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti provedena je koristeći lančanu reakciju polimerazom za identifikaciju replikona (eng. „PCR-based replicon typing“, PBRT) koja je prvi put opisana u studiji Carattoli i suradnika (101). Metoda se bazira na primjeni lančane reakcije polimerazom koristeći početnice specifične za najučestalije Inc skupine plazmida zabilježenih u enterobakterija. U ovom radu korištene su sve početnice iz studije Carattoli i suradnika (101) koje obuhvaćaju 18 različitih skupina inkompatibilnosti (FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I<sub>γ</sub>, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FIIA) uz dodatak početnica iz studije Garcia-Fernandez i suradnika (ColE, U, R) (122) i početnica za dodatnu tipizaciju L/M plazmida iz studije Poirel i suradnika (123). Sve početnice korištene za PBRT analizu prikazane su u tablici 6. Produkti lančane reakcije polimerazom vizualizirani su na način opisan u poglavlju 3.5.2.

### 3.9. STATISTIČKA ANALIZA

U statističkoj analizi podataka upotrijebljen je program SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, SAD). Usporedba zastupljenosti izolata rezistentnih na pojedine antibiotike, zastupljenosti pojedinih gena rezistencije i zastupljenosti izolata koji proizvode ESBL enzime između skupina izolata koji proizvode i ne proizvode karbapenemaze provedena je  $\chi^2$ -testom ili Fisherovim egzaktnim testom ukoliko je populacija izolata u pojedinoj skupini bila manja od 5.

Za analiza podataka dobivenih kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu i usporedbu razine ekspresije promatranih gena između analiziranih izolata i kontrolne skupine sačinjene od osjetljivih izolata divljeg tipa korišten je program REST 2009 (Qiagen, Njemačka).

## **4. REZULTATI**



#### 4.1. BAKTERIJSKI IZOLATI

Ovom studijom obuhvaćeni su svi jedinstveni izolati enterobakterija koji su prikupljeni u periodu od 1.1.2011 do 31.12.2012 kod kojih je, ponovljenim testiranjem u Referentnom centru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", utvrđeno da manifestiraju fenotip smanjene osjetljivosti na karbapeneme. U studiju je uključeno ukupno 250 kliničkih izolata od kojih je 151 pripadalo *Klebsiella pneumoniae* (60,4%), 83 *Enterobacter cloacae* (33,2 %), 10 *Enterobacter aerogenes* (4,0 %), 4 *Citrobacter freundii* (1,6 %), 1 *Klebsiella oxytoca* (0,4 %), i 1 *Proteus mirabilis* (0,4 %). Izolati uključeni u studiju prikupljeni su iz ukupno 22 mikrobiološka laboratorija, iz 15 gradova. Najveći broj kliničkih izolata prikupljen je iz Zagreba (50,0 %), Splita (14,8 %), Rijeke (12,8 %) i Zaboka (5,6 %) dok je iz preostalih 11 gradova prikupljeno 16,8 % izolata (Tablica 9.).

Podatci o kliničkim materijalima iz kojih su izolati izolirani bili su poznati za ukupno 216 izolata (86,4 %). Od toga je najviše izolata izolirano iz urina (122 izolata; 56,5 %). Iz primarno sterilnih materijala (hemokultura, likvor, žuč, ascites i centralni venski kateter) izoliran je 31 izolat (14,4 %). Iz uzoraka dišnog sustava koji su uključivali aspirat traheje, aspirat bronha, iskašljaj, sputum, bris kanile i bronhoalveolarni lavat izolirano je 25 izolata (11,6 %). Iz briseva i aspirata rana i dekubitusa izolirano 16 izolata (7,4 %), dok je iz drenažnih sadržaja prsišta i abdomena izolirano 8 (3,7 %). Iz brisa rektuma izolirano je 10 izolata (4,6 %), brisa kože 3 (1,4 %), te iz stolice jedan izolat.

**Tablica 9.** Raspodjela izolata uključenih u studiju po gradovima i ustanovama.

Grad	Ustanova	Broj kliničkih izolata po bakterijskoj vrsti						Σ	Udio (%)
		<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>		
Zagreb	Klinika za infektivne bolesti	31	7	3				125	50,0
	KB Dubrava	12	16	1					
	KB Merkur	7	10	4					
	KB Sveti Duh	6	12	1					
	KBC Sestre milosrdnice	8			1				
	ZZJZ „Dr. Andrija Štampar“	1	3		1				
	Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“	1							
Split	KBC Split	14	21	1	1		37	14,8	
Rijeka	KBC Rijeka	14					32	12,8	
	ZZJZ Primorsko-goranske županije	17				1			
Zabok	ZZJZ Krapinsko-zagorske županije	14					14	5,6	
Varaždin	ZZJZ Varaždinske županije	8	1		1		10	4,0	
Šibenik	ZZJZ Šibensko-kninske županije	7	2				9	3,6	
Bjelovar	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije		5				5	2,0	
Čakovec	ZZJZ Međimurske županije	4	1				5	2,0	
Koprivnica	ZZJZ Koprivničko-križevačke županije	1	3				4	1,6	
Dubrovnik	ZZJZ Dubrovačko-neretvanske županije	1	1				2	0,8	
Osijek	ZZJZ Osječko-baranjske županije	2					2	0,8	
Vinkovci	ZZJZ Vukovarsko srijemske županije	2					2	0,8	
Gospić	ZZJZ Ličko-senjske županije		1				1	0,4	
Požega	OB Požega	1					1	0,4	
Sisak	ZZJZ Sisačko-moslavačke županije					1	1	0,4	
	Ukupan broj izolata po vrsti	151	83	10	4	1	1	250	

#### 4.2. IDENTIFIKACIJA PROIZVODNJE BETA-AKTAMAZA FENOTIPSKIM METODAMA I DETEKCIJOM GENA

Od 250 izolata uključenih u ovu studiju fenotipskom detekcijom i identifikacijom utvrđena je prisutnost karbapenemaza u njih 74 (29,6 %). Karbapenemaze klase B detektirane su u 55 izolata (22,0 %), dok je prisutnost karbapenemaza iz klase A utvrđena u 19 izolata (7,6 %). Lančanom reakcijom polimerazom potvrđena je prisutnost karbapenemaza u svih 74 izolata, a identifikacija je bila u skladu s rezultatima fenotipske detekcije. Lančanom reakcijom polimerazom i određivanjem slijeda nukleotida detektiranih gena utvrđena je prisutnost gena *bla*<sub>KPC-2</sub> u 19 izolata, gena *bla*<sub>VIM-1</sub> u 51 izolatu te gena *bla*<sub>NDM-1</sub> u 4 izolata.

Lančanom reakcijom polimerazom detektirana je prisutnost gena *bla*<sub>OXA-48</sub> u 12 (4,8 %) izolata što je potvrđeno i određivanjem slijeda nukleotida. Proizvodnju karbapenemaze OXA-48 nije bilo moguće utvrditi fenotipskim testovima, već samo detekcijom lančanom reakcijom polimerazom kojom su analizirani svi izolati.

Od ukupno 250 analiziranih izolata, geni koji kodiraju karbapenemaze detektirani su u ukupno 86 izolata (34,4 %). Karbapenemaza VIM-1 detektirana je u najvećem broju izolata koji proizvode karbapenemaze - 59,3 %. Slijede KPC-2 u 22,1 %, OXA-48 u 14 % i NDM-1 u 4,7 % izolata koji proizvode karbapenemaze. U izolata vrste *K. pneumoniae* zabilježena je proizvodnja karbapenemaza KPC-2, VIM-1, NDM-1 i OXA-48, pri čemu je proizvodnja KPC-2 i OXA-48 detektirana samo u ove bakterijske vrste. U izolata *C. freundii* zabilježena je proizvodnja metalo-beta-laktamaza VIM-1 i NDM-1, dok je u izolata bakterijskih vrsta *E. cloacae*, *E. aerogenes* i *K. oxytoca* detektirana proizvodnja isključivo karbapenemaze VIM-1 (Tablica 10.).

**Tablica 10.** Raspodjela izolata koji proizvode karbapenemaze po bakterijskoj vrsti.

Vrsta	Broj izolata				Σ
	VIM	NDM	KPC	OXA-48	
<i>K. pneumoniae</i>	11	3	19	12	Σ
<i>E. cloacae</i>	37				
<i>E. aerogenes</i>	1				
<i>C. freundii</i>	1	1			
<i>K. oxytoca</i>	1				
Σ	51	4	19	12	86
Udio	59,3 %	4,7 %	22,1 %	14,0 %	

Fenotipskom detekcijom, ESBL fenotip zabilježen je u ukupno 155 izolata (62 %). Najviše izolata sa ESBL fenotipom pripada *K. pneumoniae* (n=122, 78,7 %) i *E. cloacae* (n=25, 16,1 %), dok ostatak čine *E. aerogenes* (n=42,6 %), *C. freundii* (n=2, 1,3 %) te *K. oxytoca* i *P. mirabilis* s po jednim izolatom. Od 155 izolata kojima je fenotipskim testiranjem utvrđen ESBL fenotip, u njih 146 (94,2 %) potvrđena je prisutnost gena  $bla_{ESBL}$ . U 142 ESBL izolata (91,6 %) detektiran je gen  $bla_{CTX-M-15}$ , u 2 izolata detektiran je gen  $bla_{SHV-12}$ , a gen  $bla_{SHV-5}$  detektiran je u samo jednom izolatu. Koprodukcija CTX-M-15 i SHV-12 detektirana je u jednom izolatu.

U 9 izolata koji su ispoljavali ESBL fenotip nisu detektirani geni  $bla_{ESBL}$ , od kojih su tri izolata proizvodila karbapenemaze (VIM, OXA-48). Ukupno je u 153 izolata detektiran gen  $bla_{CTX-M}$  i svi su proizvodili CTX-M-15 varijantu ovog enzima. Deset izolata (6,5 %) u kojih je detektirana prisutnost gena  $bla_{CTX-M-15}$ , fenotipskom detekcijom nije okarakterizirano kao ESBL. Proizvodnja karbapenemaza (NDM, VIM, OXA-48) zabilježena je u 6 takvih izolata.

ESBL fenotip utvrđen je u 30,7 % izolata koji proizvode karbapenemaze, dok je u izolata koji ne proizvode karbapenemaze taj udio iznosio 77,4 % ( $\chi^2$ ,  $p < 0,01$ ). Statistički značajna razlika u zastupljenosti ESBL fenotipa među vrstama utvrđena je između *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. 80 % izolata *K. pneumoniae* manifestiralo je ESBL fenotip, dok je kod *E. cloacae* ESBL fenotip utvrđen u svega 30 % izolata ( $\chi^2$ ,  $p < 0,01$ ).

Plazmidne beta-laktamaze AmpC detektirane su u svega 7 izolata (2,8 %) od čega je 3 pronađeno u izolatima *E. cloacae*, dva u *K. pneumoniae*, te po jedna u izolatima *E. aerogenes* i *C. freundii*. Lančanom reakcijom polimerazom gen  $bla_{FOX}$  detektiran je u samo jednom izolatu *C. freundii* dok je u svim ostalim izolatima detektiran gen  $bla_{ACC}$ . Koprodukcija plazmidnih beta-laktamaza AmpC nije zabilježena niti u jednom izolatu koji proizvodi karbapenemaze.

Od 250 izolata uključenih u ovu studiju u njih 31 (12,4 %) nije utvrđena karbapenemazna aktivnost niti prisutnost beta-laktamaza proširenog spektra, odnosno plazmidnih beta-laktamaza AmpC. Iz ove skupine izolata, 26 (84 %) otpada na izolate *E. cloacae*, 4 (13 %) na *E. aerogenes* dok *K. pneumoniae* bilježi jedan izolat.

### 4.3. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA

Vizualnom analizom makrorestriksijskih profila kromosomske DNA (pulsotipova) svih izolata uključenih u studiju, izolati *K. pneumoniae* svrstani su u 18 različitih grupa (KP-A – KP-R) (Tablica 11., Slika 15.), izolati *E. cloacae* u 22 (EC-A – EC-V) (Tablica 14., Slika 18.), *E. aerogenes* u 9 (EA-A – EA-I) (Tablica 17.) te *C. freundii* u 3 različite grupe (CF-A – CF-C) (Tablica 18.). Svaka navedena grupa se od ostalih grupa razlikuje u više od 6 DNA odsječaka u restriksijskom profilu i kao takve se smatraju nesrodnima (88).

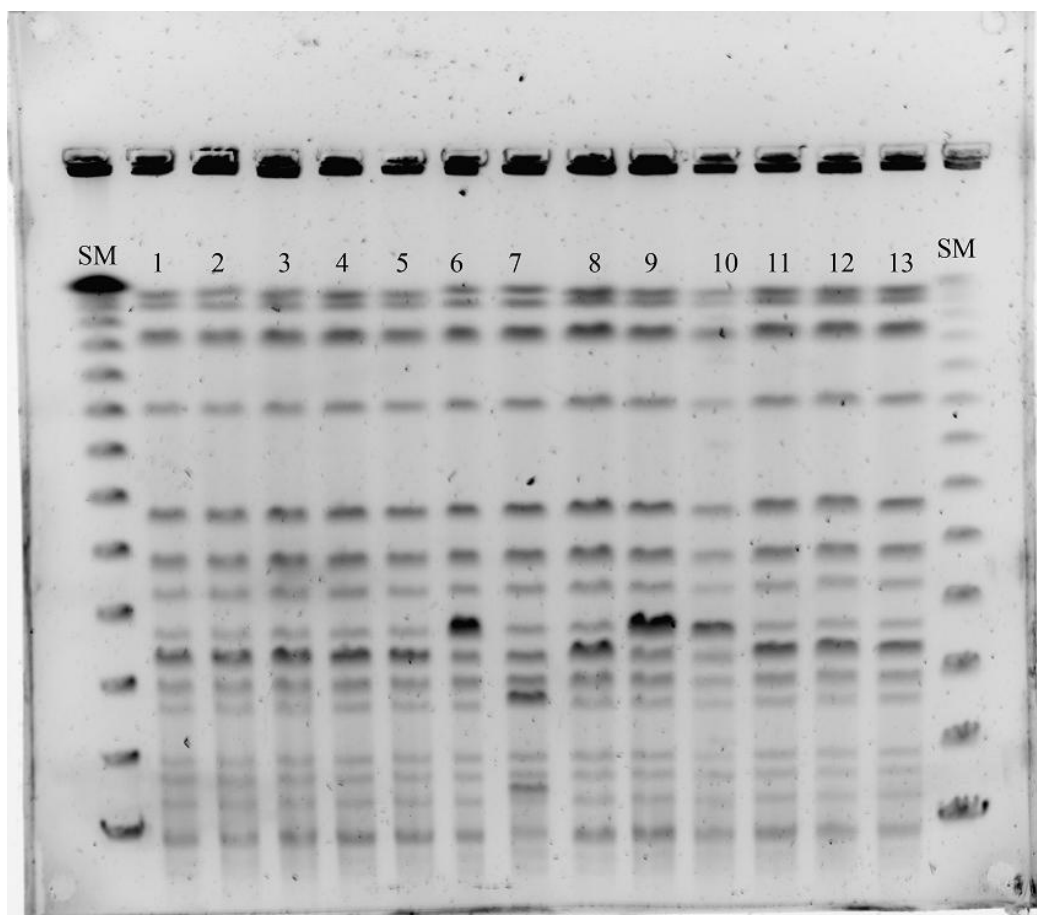
S obzirom da gel elektroforeza u izmjeničnom polju ima veću moć razlučivanja od MLST metode, određivanje klonskog tipa MLST metodom provedeno je na samo jednom predstavniku svakog pulsotipa pod pretpostavkom da svi izolati istog pulsotipa spadaju u isti klonski tip. Predstavnici svakog pulsotipa izabrani su nasumično. Ovom je metodom analizirano 42 predstavnika *K. pneumoniae* i 38 predstavnika *E. cloacae*.

Među 151 izolatom *K. pneumoniae*, MLST analizom identificirano je 13 klonskih tipova (Tablica 12., Tablica 13.). Rezultati dobiveni MLST analizom bili su u skladu s rezultatima dobivenim metodom PFGE jer je većina izolata iz pojedine PFGE grupe pripadala istom klonskom tipu. Diskrepancija je uočena kod PFGE grupe KP-E u kojoj su izolati bili raspodijeljeni u dva različita klonska tipa, dok je u grupi KP-A samo jedan izolat s pulsotipom KP-A10 pripadao drugom klonskom tipu (Tablica 11.). Kod 4 izolata *K. pneumoniae* iz PFGE grupa KP-G, KP-I, KP-N i KP-Q nije bilo moguće identificirati klonski tip MLST metodom, te su označeni kao netipabilni (NT) (Tablica 11.). Među 83 izolata *E. cloacae* identificirano je 15 klonskih tipova (Tablica 15.). U pet izolata *E. cloacae* koji su pripadali PFGE grupama EC-G i EC-V nije bilo moguće identificirati klonski tip MLST metodom te su označeni kao netipabilni (NT) (Tablica 14.).

Izolati *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze raspoređeni su u 10 PFGE grupa: KP-B, KP-C, KP-D, KP-E, KP-F, KP-G, KP-H, KP-I, KP-K i KP-P (Tablica 11.). Među navedenim PFGE grupama dominirale su KP-B, KP-C i KP-D u koje je svrstano ukupno 77,8 % izolata *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze.

Proizvodnja karbapenemaze KPC detektirana je isključivo u izolata *K. pneumoniae* iz PFGE grupe KP-B. PFGE grupa KP-B je s 19 izolata obuhvaćala 42,2 % analiziranih izolata *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze. Svi predstavnici ove grupe proizvodili su karbapenemazu KPC-2 i odgovorni su za klonsko širenje ovog gena za rezistenciju na karbapeneme na području središnje i sjeverne Hrvatske. Skoro svi izolati ovog klonskog tipa imali su identičan makrorestriksijski profil i prikupljeni su za vrijeme trajanja bolničke

epidemije KPC-2 producirajuće *K. pneumoniae* u Zaboku tijekom 2012. godine, te u KBC „Sestre milosrdnice“ i kroz djelovanje ZZJZ Varaždinske županije (Slika 14.). Samo je jedan izolat KPC-2-producirajuće *K. pneumoniae* prikazivao donekle drugačiji makrorestrikcijski profil, no radi se o izolatu uzetom iz pacijentice u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“ koja je prethodno bila hospitalizirana u SAD-u. Svi izolati ove PFGE grupe identificirani su MLST analizom kao klonski tip ST258 (Tablica 11.). Rezultati molekularne genotipizacije KPC-2 izolata iz ovog rada i opis monoklonske prirode širenja KPC-2-producirajuće *K. pneumoniae* u RH objavljeni su u studiji Jelić i suradnika iz 2016. godine (28).



**Slika 14.** Makrorestrikcijski profili 13 KPC-2-producirajućih izolata dobivenih gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju. SM – standard molekularnih masa „CHEF DNA Size Standard“, 1 – 13 – KPC-2-producirajućii izolati.

Proizvodnja karbapenemaze VIM bila je karakteristična za izolate *K. pneumoniae* iz PFGE grupa KP-D, KP-G, KP-H, KP-I. Svi izolati *K. pneumoniae* PFGE grupe KP-D proizvodili su karbapenemazu VIM-1. Ova PFGE grupa obuhvaćala je 17,7 % izolata *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze, odnosno 72,7 % izolata *K. pneumoniae* koji proizvode VIM-1. Izolati ove PFGE grupe uključeni su u klonsko širenje karbapenemaze

VIM-1 na području Zagreba, Čakovca, Varaždina i Šibenika te su MLST analizom identificirani kao klonski tip ST15 (Tablica 11.). Preostale tri PFGE grupe, u koje su svrstani VIM-1-producirajući izolati *K. pneumoniae*, čine pojedinačni izolati prikupljeni na području Zagreba i Splita (Tablica 11.).

Proizvodnja karbapenemaze NDM identificirana je u izolatima PFGE grupa KP-C i KP-F, dok je karbapenemaza OXA-48 identificirana u KP-C, KP-E, KP-K i KP-P (Tablica 11.).

Izolati PFGE grupe KP-C izolirani su u zdravstvenim ustanovama na području Zagreba i Varaždina i čine 17,7 % izolata *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze. Za razliku od ostalih grupa, u ovoj je zabilježena proizvodnja dvije različite karbapenemaze - OXA-48 i NDM-1. Izolati PFGE grupe KP-C proizvodili su karbapenemazu OXA-48 i činili su 58,3 % svih OXA-48-producirajućih izolata *K. pneumoniae*. izolirani su u KB „Dubrava“, KB Merkur, Klinici za infektivne bolesti, a jedan je prikupljen kroz redovito djelovanje ZZJZ Varaždinske županije. Jedini NDM-1 izolat iz ove grupe izoliran je u Klinici za infektivne bolesti. Svi izolati PFGE skupine KP-C spadali su u klonski tip ST16 (Tablica 11.). Preostala dva izolata *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemazu NDM-1 spadala su u PFGE grupu KP-F, izolirani su u Klinici za infektivne bolesti i identificirani su kao klonski tip ST15.

PFGE grupu KP-E sačinjavali su pretežito izolati klonskog tipa ST15, dok su dva bila ST528. Samo 3 izolata, klonskih tipova ST15 i ST528 izolirana u KB Sveti duh, proizvodila su karbapenemazu OXA-48, dok proizvodnja karbapenemaza u ostalih izolata ove PFGE grupe nije uočena. Preostale dvije PFGE grupe izolata *K. pneumoniae* koji su proizvodili karbapenemazu OXA-48 (KP-K i KP-P) čine pojedinačni izolati prikupljeni na području Zagreba i Varaždina te su MLST analizom identificirani kao klonski tipovi ST37 odnosno ST1418 (Tablica 11.). Poliklonska priroda širenja OXA-48-producirajuće *K. pneumoniae* objavljena je, na temelju rezultata iz ovog rada, u studiji Jelić i suradnika iz 2017. godine (32).

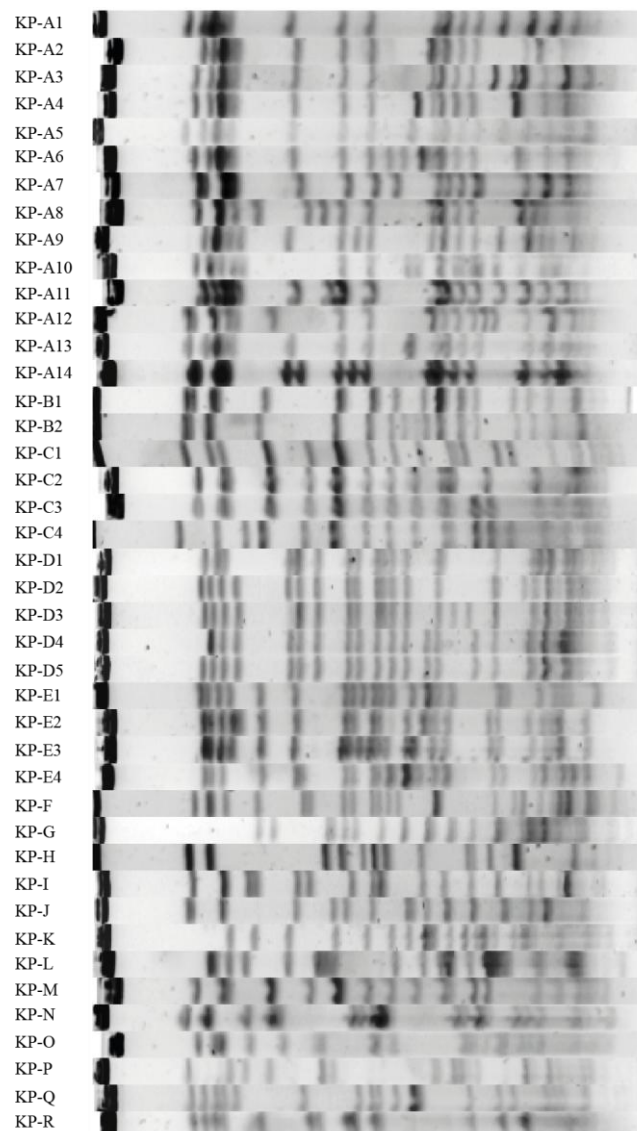
Izolati *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze razvrstani su u ukupno 9 PFGE grupa: KP-A, KP-C, KP-E, KP-J, KP-L, KP-M, KP-N, KP-O, KP-Q i KP-R.

U grupu KP-A spadalo je 88,7 % izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze. Svi izolati, osim jednog s pulsotipom KP-A10, iz ove PFGE grupe identificirani su kao klonski tip ST437. Izolat pulsotipa KP-A10 identificiran je kao klonski tip ST11. Grupi KP-A čini 14 podgrupa (KP-A1 - KP-A14), niti jedan izolat *K. pneumoniae* iz ove grupe nije proizvodio karbapenemaze, no u 97,9 % izolata iz ove PFGE grupe

detektirana je proizvodnja beta-laktamaze CTX-M-15. Izolati PFGE grupe KP-A prikupljeni su iz 16 zdravstvenih ustanova raspoređenih u 10 gradova na području RH (Tablica 11.).

Heterogena PFGE grupa KP-E je, uz već opisane izolate koji proizvode karbapenemaze, bila sačinjena i od tri izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze. Izolati *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze iz PFGE grupe KP-E prikupljeni su iz ustanova na području Splita, Vinkovaca i Zagreba (Tablica 11.).

Preostalih 8 PFGE grupa bilo je sačinjeno od pojedinačnih izolata i ukupno su obuhvaćale 6,6 % izolata *K. pneumoniae* koji nisu proizvodili karbapenemaze (Tablica 11.).



**Slika 15.** Prikaz svih makrorestriksijskih profila izolata *K. pneumoniae* dobivenih gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju.



**Tablica 11.** Distribucija svih izolata *K. pneumoniae* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih genotipizacijom metodom PFGE.

PFGE grupa (n)	Pulsotip (n)	MLST	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije*
			Grad	n	Ustanova	n	
A (94)	A1 (59)	ST437	Zagreb	27	Klinika za infektivne bolesti	18	ESBL
					KB Dubrava	5	
					KB Merkur	2	
					KB Sveti Duh	2	
			Rijeka	20	KBC Rijeka	11	
					ZZJZ Primorsko-goranske županije	9	
			Split	5	KBC Split	5	
			Zabok	2	ZZJZ Krapinsko-zagorske županije	2	
	Osijek	2	ZZJZ Osječko-baranjske županije	2			
	Dubrovnik	1	ZZJZ Dubrovačko-neretvanske županije	1			
	Požega	1	OB Požega	1			
	Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1			
	A2 (3)	ST437	Zagreb	2	ZZJZ Primorsko-goranske županije	2	ESBL
			Rijeka	1	klinika za infektivne bolesti	1	
	A3 (17)	ST437	Rijeka	5	ZZJZ Primorsko-goranske županije	5	ESBL
			Šibenik	4	ZZJZ Šibensko-kninske županije	4	
			Zagreb	3	KBC "Sestre milosrdnice"	3	
			Čakovec	2	ZZJZ Međimurske županije	2	
			Varaždin	2	ZZJZ Varaždinske županije	2	
	Split	1	KBC Split	1			
A4 (2)	ST437	Rijeka	1	KBC Rijeka	1	-	
		Split	1	KBC Split	1	ESBL	
A5 (1)	ST437	Rijeka	1	ZZJZ Primorsko-goranske županije	1	ESBL	
A6 (1)	ST437	Split	1	KBC Split	1	ESBL	
A7 (1)	ST437	Šibenik	1	ZZJZ Šibensko-kninske županije	1	ESBL	
A8 (1)	ST437	Zagreb	1	KB Dubrava	1	ESBL	
A9 (2)	ST437	Zagreb	2	KB Merkur	2	ESBL	
A10 (1)	ST11	Zagreb	1	ZZJZ "Dr. Andrija Štampar"	1	AmpC	
A11 (1)	ST437	Rijeka	1	ZZJZ Primorsko-goranske županije	1	ESBL	
A12 (1)	ST437	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL	
A13 (2)	ST437	Čakovec	1	ZZJZ Međimurske županije	1	ESBL	
	ST437	Rijeka	1	KBC Rijeka	1	ESBL	
A14 (2)	ST437	Split	2	KBC Split	2	ESBL	
B (19)	B1 (18)	ST258	Zabok	12	ZZJZ Krapinsko-zagorske županije	12	KPC
			Zagreb	4	KBC "Sestre milosrdnice"	4	
			Varaždin	2	ZZJZ Varaždinske županije	2	
	B2 (1)	ST258	Zagreb	1	Klinika za plućne bolesti "Jordanovac"	1	KPC

\* - primarni mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike

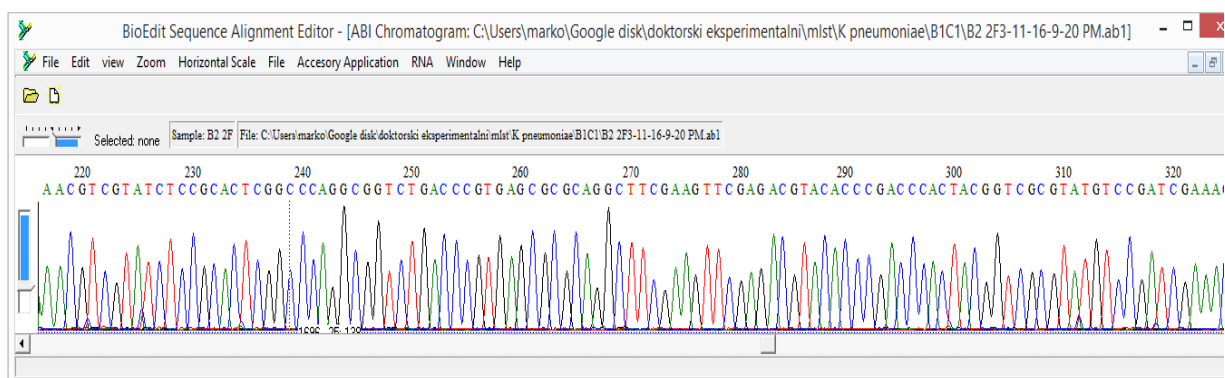
**Tablica 11.** – nastavak.

PFGE grupa (n)	Pulsotip (n)	MLST	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije*
			Grad	n	Ustanova	n	
C (9)	C1 (4)	ST16	Zagreb	3	KB Dubrava	1	OXA-48
					KB Merkur	1	OXA-48
					Klinika za infektivne bolesti	1	NDM
			Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1	OXA-48
	C2 (2)	ST16	Zagreb	2	KB Dubrava	1	OXA-48
					Klinika za infektivne bolesti	1	ESBL
	C3 (2)	ST16	Zagreb	2	KB Dubrava	1	OXA-48
					Klinika za infektivne bolesti	1	
C4 (1)	ST16	Zagreb	1	KB Dubrava	1	OXA-48	
D (8)	D1 (3)	ST15	Zagreb	3	Klinika za infektivne bolesti	2	VIM
					KB Dubrava	1	
	D2 (2)	ST15	Čakovec	1	ZZJZ Međimurske županije	1	VIM
			Zagreb	1	KB Dubrava	1	
	D3 (1)	ST15	Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1	VIM
D4 (1)	ST15	Šibenik	1	ZZJZ Šibensko-kninske županije	1	VIM	
D5 (1)	ST15	Šibenik	1	ZZJZ Šibensko-kninske županije	1	VIM	
E (6)	E1 (2)	ST15	Zagreb	2	KB Sveti Duh	2	OXA-48
	E2 (1)	ST15	Vinkovci	1	ZZJZ Vukovarsko-srijemske županije	1	ESBL
	E3 (2)	ST528	Zagreb	1	KB Sveti Duh	1	OXA-48
				1	Klinika za infektivne bolesti	1	ESBL/AmpC
E4 (1)	ST15	Split	1	KBC Split	1	ESBL	
F (2)	ST15	Zagreb	2	Klinika za infektivne bolesti	2	NDM	
G (1)	NT	Zagreb	1	KBC "Sestre milosrdnice"	1	VIM	
H (1)	ST248	Zagreb	1	KB Sveti Duh	1	VIM	
I (1)	NT	Split	1	KBC Split	1	VIM	
J (1)	ST29	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	ESBL	
K (1)	ST37	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	OXA-48	
L (1)	ST13	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL	
M (1)	ST437	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	ESBL	
N (1)	NT	Rijeka	1	KBC Rijeka	1	ESBL	
O (1)	ST101	Koprivnica	1	ZZJZ Koprivničko-križevačke županije	1	ESBL	
P (1)	ST1418	Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1	OXA-48	
Q (1)	NT	Vinkovci	1	ZZJZ Vukovarsko-srijemske županije	1	ESBL	
R (2)	ST14	Split	2	KBC Split	2	ESBL	

\* - primarni mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike

Distribucija svih izolata *K. pneumoniae* analiziranih u ovom radu na temelju podataka dobivenih MLST analizom i proizvodnja karbapenemaza KPC, VIM, NDM i OXA-48 u analiziranim izolatima *K. pneumoniae* po klonским grupama i tipovima prikazana je u tablici 13. Koristeći program eBURST v3 uspoređeni su podaci dobiveni MLST analizom s bazom podataka koja sadržava 2844 do sad zabilježena klonска tipa i utvrđeno je da svi klonски tipovi *K. pneumoniae* analizirani u ovom radu (osim ST1418) spadaju u isti klonски kompleks – CC11. Zbog velikog broja klonских tipova koje CC11 obuhvaća (1273 klonска tipa, 45 % od svih zabilježenih tipova), klonски tipovi identificirani u ovom radu koji spadaju u CC11, dodatno su razvrstani u klonске grupe. Klonске grupe su podgrupe klonskog kompleksa i svaku čini klonски tip „osnivač“ i dvije razine srodnih klonских tipova. Prvu razinu čine klonски tipovi koji se od „osnivača“ razlikuju u samo jednom od 7 lokusa dok drugu razinu čine pripadajući klonски tipovi koji se od klonских tipova iz prva razine također razlikuju u samo jednom lokusu. Ime klonске grupe definira se prema klonskom tipu koji je osnivač grupe. Dvanaest klonских tipova *K. pneumoniae* iz CC11 raspoređeno je u ukupno 10 klonских grupa. ST248 unutar CC11 ne spada niti u jednu klonску grupu (Tablica 13.). Klonски tip ST1418 ne spada niti u jedan klonски kompleks već sam za sebe čini singlet (od eng. „singleton“).

Primjer izgleda „sirovih-rezultata“ (elektroferograma) dobivenih određivanjem slijeda nukleotida u analiziranim genima prikazan je na slici 16. Populacijska struktura izolata *K. pneumoniae* analiziranih u ovom radu, prikazana u globalnom kontekstu 2844 klonска tipa *K. pneumoniae* iz MLST baze podataka (lipanj 2017), prikazana je na slici 17.



**Slika 16.** Segment elektroferograma dobiven određivanjem slijeda nukleotida uređajem ABI prism® 310

**Tablica 12.** Klonski tipovi *Klebsiella pneumoniae* identificirani u ovom radu i pripadajuće kombinacije alela

<b>ST</b>	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdH</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
<b>11</b>	3	3	1	1	1	1	4
<b>437</b>	3	3	1	1	1	1	31
<b>258</b>	3	3	1	1	1	1	79
<b>16</b>	2	1	2	1	4	4	4
<b>15</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>14</b>	1	6	1	1	1	1	1
<b>528</b>	32	5	1	1	9	4	18
<b>13</b>	2	3	1	1	10	1	19
<b>29</b>	2	3	2	2	6	4	4
<b>37</b>	2	9	2	1	13	1	16
<b>101</b>	2	6	1	5	4	1	6
<b>248</b>	4	1	5	1	9	4	4
<b>1418</b>	4	3	1	6	1	1	16

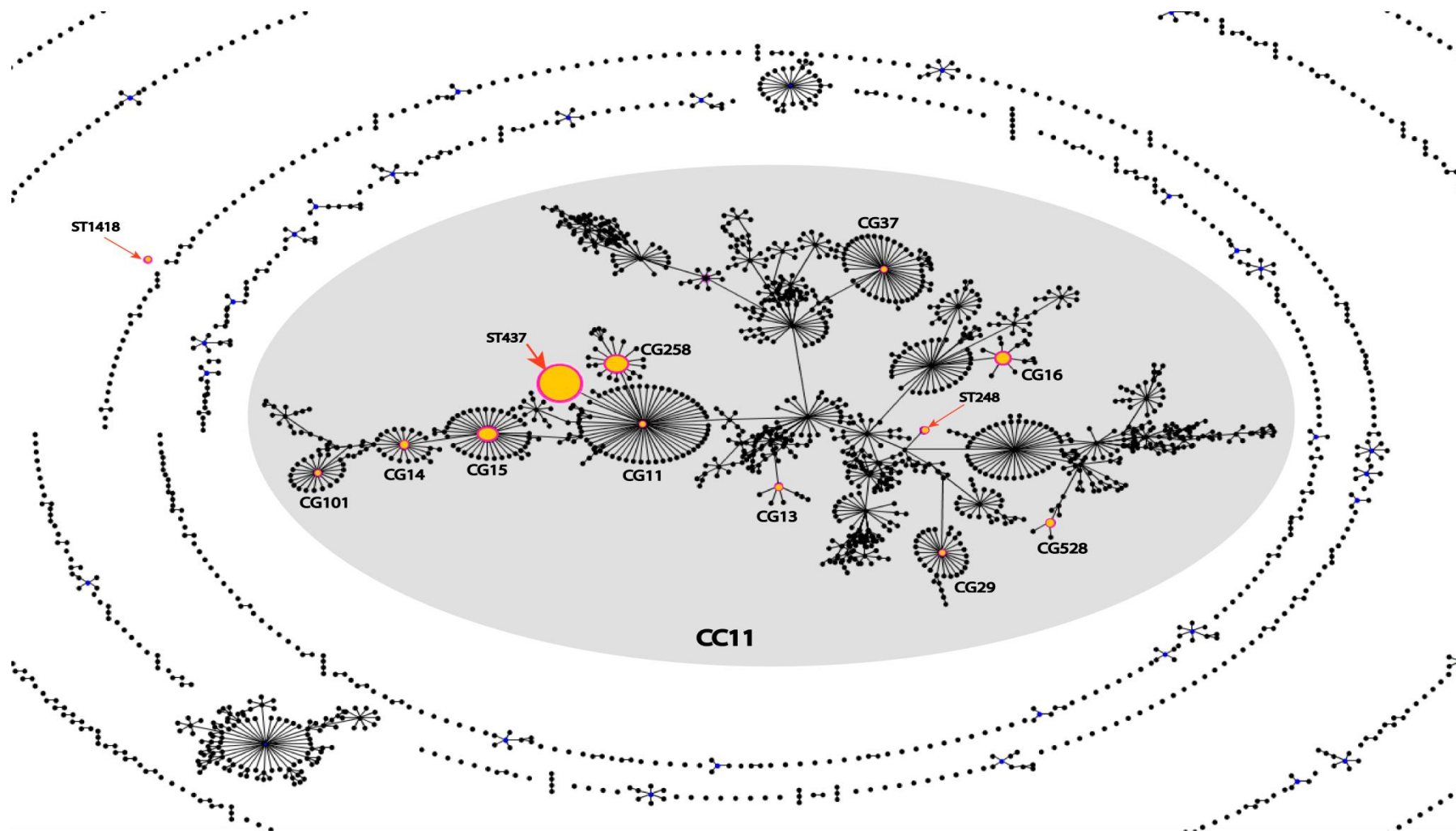
**Tablica 13.** Distribucija svih izolata *K. pneumoniae* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih MLST analizom

Klonska kategorija	ST	n (%)	Grad	Broj izolata	PFGE Grupa	Karbapenemaza
CG11	ST11*	1 (0,7%)	Zagreb	1	A	
	ST437	94 (62,2%)	Zagreb	37	A, M	
			Rijeka	30	A	
			Split	10	A	
			Šibenik	5	A	
			Čakovec	3	A	
			Varaždin	3	A	
			Osijek	2	A	
			Zabok	2	A	
			Dubrovnik	1	A	
			Požega	1	A	
CG258	ST258*	19 (12,6%)	Zabok	12	B	KPC
			Zagreb	5	B	KPC
			Varaždin	2	B	KPC
CG16	ST16*	9 (5,9%)	Zagreb	8	C	OXA-48 , NDM
			Varaždin	1	C	OXA-48
CG15	ST15*	14 (9,2%)	Zagreb	8	D, E, F	VIM , OXA-48, NDM
			Šibenik	2	D	VIM
			Čakovec	1	D	VIM
			Split	1	E	
			Varaždin	1	D	VIM
			Vinkovci	1	E	
CG14	ST14*	2 (1,3%)	Split	2	R	
GC528	ST528*	2 (1,3%)	Zagreb	2	E	OXA-48
CG13	ST13*	1 (0,7%)	Zagreb	1	L	
CG29	ST29*	1 (0,7%)	Zagreb	1	J	
CG37	ST37*	1 (0,7%)	Zagreb	1	K	OXA-48
CG101	ST101*	1 (0,7%)	Koprivnica	1	O	
	ST248	1 (0,7%)	Zagreb	1	H	VIM
singlet	ST1418	1 (0,7%)	Varaždin	1	P	OXA-48
NT		4 (2,6%)	Zagreb	1	G	VIM
			Split	1	I	VIM
			Rijeka	1	N	
			Vinkovci	1	Q	

\* - osnivač klonske grupe

n – broj izolata

NT – nije tipabilan



**Slika 17.** Populacijska struktura izolata *K. pneumoniae* analiziranih u ovom radu, prikazana u globalnom kontekstu 2844 klonska tipa *K. pneumoniae* iz MLST baze podataka (lipanj 2017). Svaka točka predstavlja jedan klonski tip. Klonski tipovi identificirani u ovom radu označeni su žutom bojom. Veličina kruga odgovara broju izolata koji pripadaju klonskom tipu. Klonski tipovi koji su „osnivači“ klonskih grupa označeni su nazivom pripadajuće klonske grupe (CG), klonski tipovi koji nisu osnivači klonskih grupa označeni su strelicom i pravim imenom (ST). Linije povezuju klonske tipove koji se razlikuju u samo jednom alelu. CC – klonski kompleks, CG – klonska grupa, ST – klonski tip.

U analiziranih izolata *E. cloacae* proizvodnja karbapenemaze VIM-1 detektirana je u izolata iz PFGE grupa EC-A, EC-C, EC-F i EC-L. 36 od 37 izolata *E. cloacae* koji proizvode karbapenemazu VIM-1 spadalo je u PFGE grupe EC-A, EC-C i EC-F (Tablica 14.).

PFGE grupu EC-A činilo je 20 izolata koji su obuhvaćali 51,4 % izolata koji proizvode VIM-1 karbapenemazu iako u jednog izolata iz ove skupine proizvodnja karbapenemaze nije detektirana. 75 % izolata ove PFGE grupe prikupljeno je u KBC Split, koji je prepoznat kao žarište ovog klona, dok su preostali izolati izolirani na području Zagreba i Šibenika. Izolati ove PFGE skupine identificirani su kao klonski tip ST92 (Tablica 14.).

Svi izolati PFGE grupe EC-C prikupljeni su na području Zagreba, i njihova raširenost bila je ograničena samo na KB Dubrava. Ova PFGE grupa od 9 izolata činila je 24,3 % izolata *E. cloacae* koji proizvode karbapenemaze. Izolati PFGE grupe EC-F većinom su prikupljeni iz ustanova na području Zagreba, Klinike za infektivne bolesti, ZZJZ „Andrija Štampar“ i KB Dubrava dok su pojedinačni izolati prikupljeni na području Bjelovara i Gospića. U PFGE grupu EC-F spadalo je 21,6 % izolata *E. cloacae* koji proizvode karbapenemaze. Izolati PFGE grupe EC-C i EC-F pripadali su klonskim tipovima ST200, odnosno ST105 (Tablica 14.). Podatci o izolatu iz PFGE grupe EC-L prikazani su u tablici 13.

Izolati *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze raspoređeni su u 18 PFGE grupa. Među njima, izraženije epidemiološko značenje u ovom kontekstu imale su grupe EC-B, EC-D, EC-E i EC-G koje su obuhvaćale 63 % izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze. Preostalih 14 PFGE grupa činili su pojedinačni izolati (Tablica 14.).

PFGE grupa EC-D bila je najdominantnija, obuhvaćala je 34,8 % izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze. Žarište ove grupe bilo je u Zagrebu (KB Sveti duh), gdje je izolirano 11 od ukupno 16 izolata. Preostali izolati prikupljeni su iz Klinike za infektivne bolesti, KB Merkur, KBC Split i ZZJZ Međimurske županije (Tablica 14.).

Izolati iz PFGE grupe EC-E prikazivali su sličan makrorestriksijski profil onom grupe EC-D, no prema kriterijima navedenim u radu Tenover i suradnika (88) nisu uključeni u istu PFGE grupu. Ova grupa obuhvaćala je 8,7 % izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze i sva 4 izolata PFGE grupe EC-E prikupljena su na području Zagreba kao pojedinačni izolati iz KB Dubrava, KB Sveti Duh, KB Merkur i Klinike za infektivne bolesti (Tablica 14.). Izolati PFGE grupa EC-D i EC-E identificirani su kao klonski tip ST114 (Tablica 14.).

Izolati PFGE grupe EC-B prikupljeni su na području Zagreba, Bjelovara i Koprivnice, te su identificirani kao klonski tip ST66, obuhvaćali su 10,9 % izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze (Tablica 14.). Izolati skupine EC-G uglavnom su izolirani u KBC

Split, MLST metodom nisu mogli biti tipizirani i činili su 8,7 % izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze. Podatci o preostalih 14 PFGE grupa izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze prikazani su u tablici 14.

**Tablica 14.** Distribucija svih izolata *E. cloacae* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih genotipizacijom metodom PFGE.

PFGE grupa (n)	Pulsotip (n)	MLST	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije*
			Grad	n	Ustanova	n	
A (20)	A1 (19)	ST92	Split	14	KBC Split	14	VIM
			Zagreb	3	KB Merkur	2	
					KB Dubrava	1	
	Šibenik	2	ZZJZ Šibensko-kninske županije	2	VIM		
	A2 (1)	ST92	Split	1	KBC Split	1	VIM
B (5)	B1 (1)	ST66	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
	B2 (1)		Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
	B3 (1)		Zagreb	1	ZZJZ "Dr. Andrija Štampar"	1	
	B4 (1)		Bjelovar	1	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije	1	
	B5 (1)		Koprivnica	1	ZZJZ Koprivničko-križevačke županije	1	ESBL
C (9)	C1 (8)	ST200	Zagreb	8	KB Dubrava	8	VIM
	C2 (1)		Zagreb	1	KB Dubrava	1	VIM
D (16)	D1 (12)	ST114	Zagreb	11	KB Sveti Duh	10	
					Klinika za infektivne bolesti	1	
			Split	1	KBC Split	1	
	D2 (1)	ST114	Čakovec	1	ZZJZ Međimurske županije	1	
	D3 (1)	ST114	Zagreb	1	KB Sveti Duh	1	ESBL
D4 (2)	ST114	Zagreb	2	KB Merkur	1	ESBL	
				Klinika za infektivne bolesti	1		

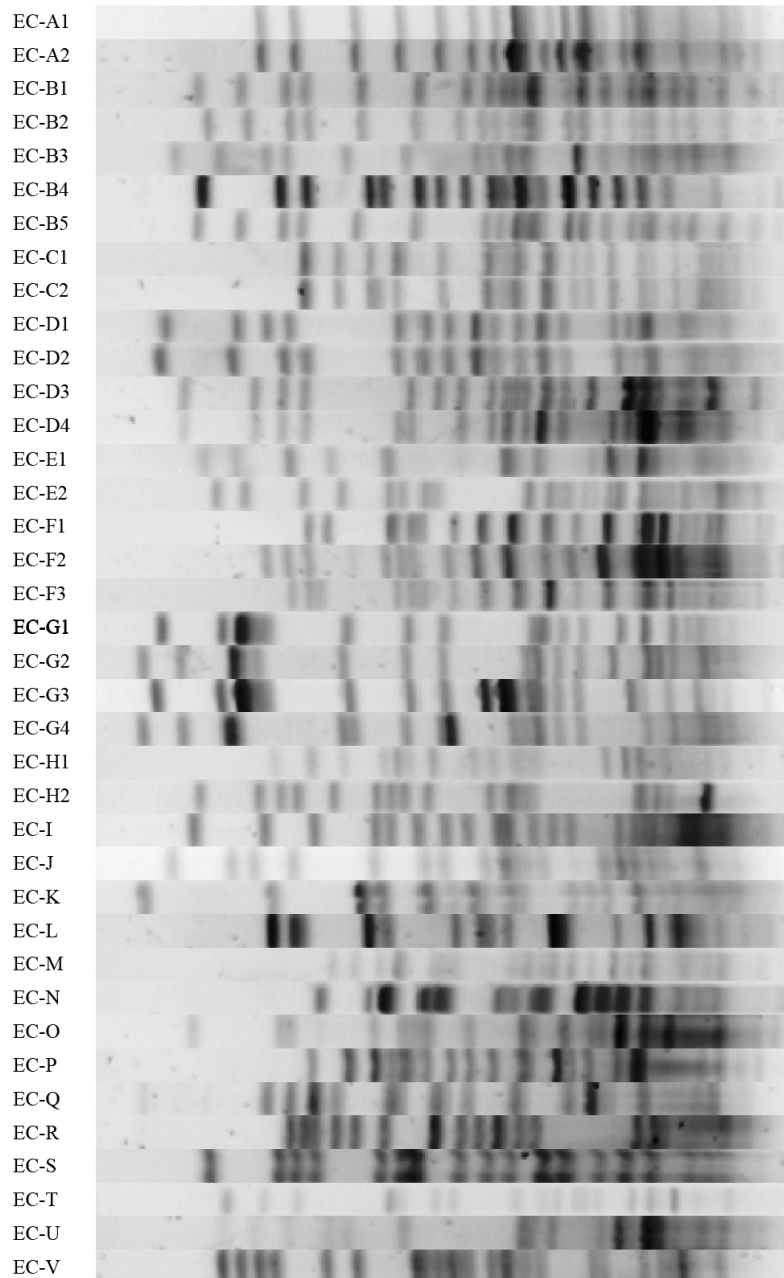
\* - primarni mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike



**Tablica 14.** - nastavak

PFGE grupa (n)	Pulsotip (n)	MLST	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije*
			Grad	n	Ustanova	n	
E (4)	E1 (2)	ST114	Zagreb	2	KB Dubrava	1	ESBL
					KB Sveti Duh	1	
	E2 (2)		Zagreb	2	KB Merkur	1	
					Klinika za infektivne bolesti	1	
F (8)	F1 (6)	ST105	Zagreb	4	Klinika za infektivne bolesti	2	VIM
					ZZJZ "Dr. Andrija Štampar"	1	
					KB Dubrava	1	
			Bjelovar	1	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije	1	
	Gospić		1	ZZJZ Ličko-senjske županije	1		
	F2 (1)		ST105	Zagreb	1	ZZJZ "Dr. Andrija Štampar"	
F3 (1)	ST105	Bjelovar	1	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije	1	VIM	
G (4)	G1 (1)	NT	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	ESBL
	G2 (1)		Split	1	KBC Split	1	ESBL
	G3 (1)		Split	1	KBC Split	1	ESBL
	G4 (1)		Split	1	KBC Split	1	ESBL
H (2)	H1 (1)	ST90	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
	H2 (1)	ST90	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	
I (1)		ST90	Zagreb	1	KB Merkur	1	
J (1)		ST90	Split	1	KBC Split	1	ESBL
K (1)		ST90	Zagreb	1	KB Dubrava	1	
L (1)		ST100	Zagreb	1	KB Dubrava	1	VIM
M (1)		ST133	Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1	ESBL
N (1)		ST133	Zagreb	1	KB Merkur	1	AmpC
O (1)		ST542	Koprivnica	1	ZZJZ Koprivničko-križevačke županije	1	ESBL
P (1)		ST78	Bjelovar	1	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije	1	
Q (1)		ST104	Bjelovar	1	ZZJZ Bjelovarsko -bilogorske županije	1	
R (1)		ST550	Split	1	KBC Split	1	
S (1)		ST122	Koprivnica	1	ZZJZ Koprivničko-križevačke županije	1	
T (1)		ST51	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
U (2)		ST171	Zagreb	2	KB Dubrava	2	
V (1)		NT	Dubrovnik	1	ZZJZ Dubrovačko-neretvanske županije	1	

\* - primarni mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike



**Slika 18.** Prikaz svih makrorestrikcijskih profila izolata *E. cloacae* dobivenih gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju.

Distribucija svih izolata *E. cloacae* analiziranih u ovom radu na temelju podataka dobivenih MLST analizom i proizvodnja karbapenemaze VIM u analiziranim izolatima *E. cloacae* po klonskim tipovima prikazana je u tablici 16. Svih 15 klonskih tipova *E. cloacae* identificiranih u ovom radu uspoređeno je, koristeći eBURST v3, sa cijelom MLST bazom podataka koja sadrži 918 zabilježenih klonskih tipova *E. cloacae*. ST92 je identificiran kao singlet; ST104, ST122 i ST550 svrstani su u 3 različita dubleta. Dublet je kategorija struktura koju čine 2 klonska tipa koja se razlikuju u samo jednom lokusu. Jedanaest preostalih klonskih tipova svrstano je u 7 različitih klonskih kompleksa (Tablica 16.).

Populacijska struktura izolata *E. cloacae* analiziranih u ovom radu, prikazana u globalnom kontekstu 918 klonskih tipova *E. cloacae* iz MLST baze podataka (lipanj 2017), prikazana je na slici 19.

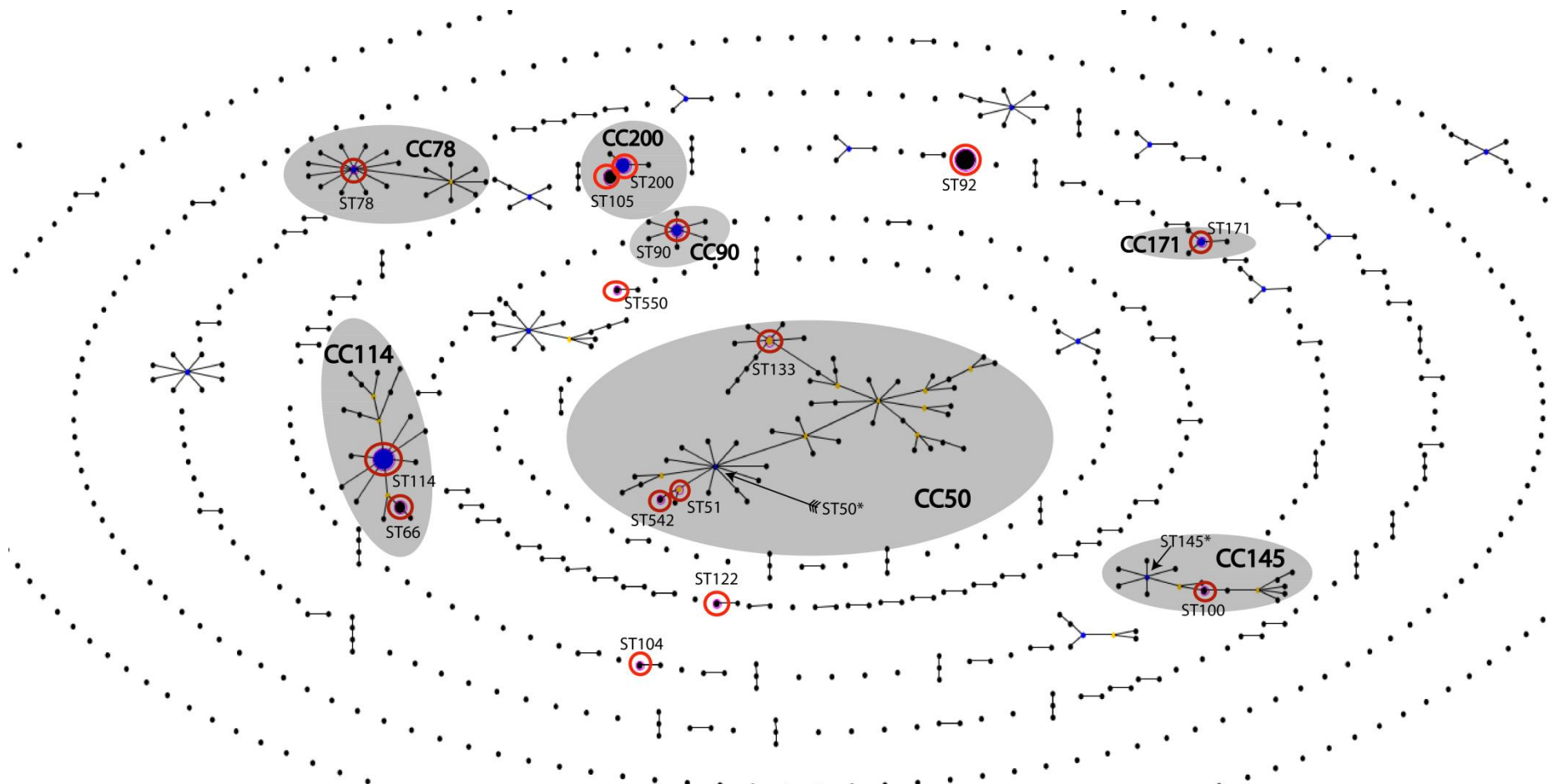
**Tablica 15.** Klonski tipovi *Enterobacter cloacae* identificirani u ovom radu i pripadajuće kombinacije alela

ST	<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
114	53	35	20	44	45	4	6
66	52	21	20	44	45	4	6
92	52	20	19	44	45	12	32
200	74	20	20	65	45	4	32
105	74	20	20	65	45	4	6
90	58	37	4	6	42	4	25
133	11	4	4	13	39	4	9
51	4	4	4	6	37	4	6
542	178	4	4	6	92	4	6
171	49	21	19	44	45	12	32
78	8	9	6	9	9	6	8
100	59	40	12	9	35	6	6
104	59	40	76	9	70	6	6
122	63	3	51	35	77	27	3
550	179	4	4	6	112	4	6

**Tablica 16.** Distribucija svih izolata *E. cloacae* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih MLST analizom

Klonska struktura	n (%)	ST	n (%)	Grad	Broj izolata	PFGE grupa	Karbapenemaza
CC114	25 (30,1%)	ST114*	20 (24,1%)	Zagreb	18	D, E	
				Čakovec	1	D	
				Split	1	D	
		ST66	5 (6%)	Zagreb	3	B	
				Bjelovar	1	B	
				Koprivnica	1	B	
Singlet	20 (24,1%)	ST92	20 (24,1%)	Split	15	A	VIM
				Zagreb	3	A	VIM
				Šibenik	2	A	VIM
CC200	17 (20,5%)	ST200*	9 (10,8%)	Zagreb	9	C	VIM
				Zagreb	5	F	VIM
		ST105	8 (9,7%)	Bjelovar	2	F	VIM
				Gospić	1	F	VIM
				Zagreb	4	H, I, K	
CC90	5 (6%)	ST90*	5 (6%)	Split	1	J	
				Zagreb	1	J	
CC50	4 (4,8%)	ST133	2 (2,4%)	Varaždin	1	M	
				Zagreb	1	N	
		ST51	1 (1,2%)	Zagreb	1	T	
		ST542	1 (1,2%)	Koprivnica	1	O	
CC171	2 (2,4%)	ST171*	2 (2,4%)	Zagreb	2	U	
CC78	1 (1,2%)	ST78	1 (1,2%)	Bjelovar	1	P	
CC145	1 (1,2%)	ST100	1 (1,2%)	Zagreb	1	L	VIM
Dublet ST104-ST345	1 (1,2%)	ST104	1 (1,2%)	Bjelovar	1	Q	
Dublet ST122-ST770	1 (1,2%)	ST122	1 (1,2%)	Koprivnica	1	S	
Dublet ST550-ST543	1 (1,2%)	ST550	1 (1,2%)	Split	1	R	
NT			5 (6%)	Split	3	G	
				Zagreb	1	G	
				Dubrovnik	1	V	

n – broj izolata  
NT – nije tipabilan



**Slika 19.** Populacijska struktura izolata *E. cloacae* analiziranih u ovom radu, prikazana u globalnom kontekstu 918 klonskih tipova *E. cloacae* iz MLST baze podataka (lipanj 2017). Svaka točka predstavlja jedan klonski tip. Klonski tipovi identificirani u ovom radu označeni su crvenim krugom. Veličina točke unutar kruga odgovara broju izolata koji pripadaju klonskom tipu. Klonski tipovi „osnivači“ klonskog kompleksa identificirani u ovom radu označeni su plavom bojom, klonski tipovi „osnivači“ klonskog kompleksa, a nisu identificirani u ovom radu označeni su sa - \*. Linije povezuju klonske tipove koji se razlikuju u samo jednom alelu. CC – klonski kompleks, ST – klonski tip

Izolati *E. aerogenes* razvrstani su u 9 grupa restriksijskih profila. Samo su dva izolata prikazivala identičan restriksijski profil dok je sve ostale karakterizirao različit restriksijski profil zbog čega su svrstani u pojedinačne grupe (Tablica 17.). Sva četiri izolata *C. freundii* svrstana su u ukupno 3 različite PFGE grupe (Tablica 18.).

**Tablica 17.** Distribucija svih izolata *E. aerogenes* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih genotipizacijom metodom PFGE

PFGE Grupa (n)	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije
	Grad	n	Ustanova	n	
EA-A (2)	Zagreb	2	Klinika za infektivne bolesti	2	
EA-B (1)	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
EA-C (1)	Zagreb	1	KB Dubrava	1	
EA-D (1)	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
EA-E (1)	Zagreb	1	KB Merkur	1	ESBL
EA-F (1)	Zagreb	1	Klinika za infektivne bolesti	1	
EA-G (1)	Split	1	KBC Split	1	AmpC
EA-H (1)	Zagreb	1	KB Merkur	1	VIM
EA-I (1)	Zagreb	1	KB Sveti Duh	1	ESBL

n – broj izolata

**Tablica 18.** Distribucija svih izolata *C. freundii* uključenih u studiju na temelju podataka dobivenih PFGE metodom genotipizacije

PFGE grupa (n)	Podgrupa (n)	Broj izolata (n)				Mehanizam rezistencije
		Grad	n	Ustanova	n	
CF-A (1)	A1 (1)	Zagreb	1	ZZJZ "Dr. Andrija Štampar"	1	VIM
	A2 (1)	Varaždin	1	ZZJZ Varaždinske županije	1	
CF-B (1)		Zagreb	1	KBC "Sestre milosrdnice"	1	NDM
CF-C (1)		Split	1	KBC Split	1	ESBL

n – broj izolata

#### 4.4. TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA NA ANTIBIOTIKE

Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je kod svih 250 izolata. Osjetljivost svakog izolata testirana je na ukupno 15 antibiotika razvrstanih u 9 klasa: penicilini, penicilin+inhibitor beta-laktamaza, antipseudomonasni penicilin + inhibitor beta-laktamaza, cefalosporini prve i druge generacije, cefalosporini proširenog spektra treće i četvrte generacije, karbapenemi, aminoglikozidi, kombinacija trimetoprima i sulfonamida te fluorokinoloni. Testiranjem osjetljivosti na antibiotike disk-difuzijskom metodom po Kirby-Baueru utvrđeno je da su od 250 izolata skoro svi ispoljavali višestruko rezistentan (eng. „multi drug resistance“, MDR) fenotip, tj. da nisu bili osjetljivi (I+R) na barem jedan antibiotik iz minimalno tri različite klase antibiotika. Među analiziranim izolatima zabilježen je visok udio rezistencije na peniciline, kombinaciju penicilina i inhibitora beta-laktamaza, cefalosporine, fluorokinolone i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola.

Analizirani izolati ispoljavali su varijabilnu rezistenciju na karbapeneme.

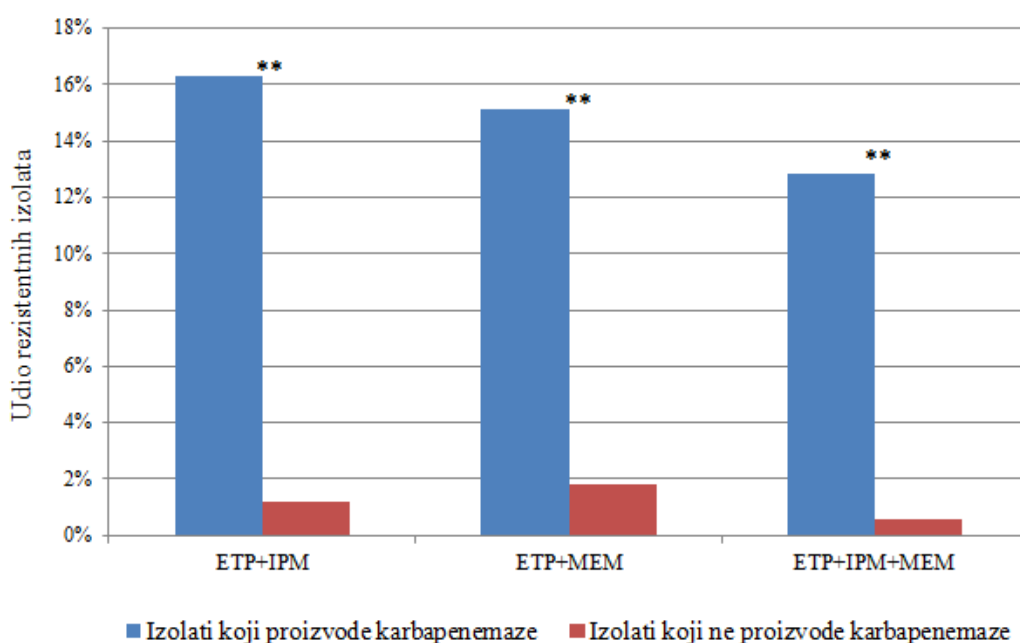
Epsilometarskim testom utvrđeno je da je 81,2 % izolata bilo rezistentno na ertapenem, dok je po 6,4 % izolata bilo rezistentno na imipenem odnosno meropenem. Ukupno 98 % izolata nije bilo osjetljivo na ertapenem (I+R), dok na imipenem, odnosno meropenem nije bilo osjetljivo 22 % izolata (Tablica 20.). Dva posto izolata koji su bili osjetljivi na ertapenem bilo je osjetljivo i na preostale karbapeneme, no uključeni su u istraživanje jer je u njih detektirana proizvodnja karbapenemaze VIM-1. Jednak udio izolata rezistentnih na imipenem i meropenem nije posljedica korezistencije na ova dva antibiotika. Udio izolata rezistentnih na ertapenem, imipenem i meropenem u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze prikazan je u tablici 19.

**Tablica 19.** Udio izolata rezistentnih na ertapenem, imipenem i meropenem u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze

Antibiotik	Udio rezistentnih izolata (%)		p ( $\chi^2$ )
	Proizvode karbapenemaze	Ne proizvode karbapenemaze	
Ertapenem	77,9	82,9	
Imipenem	16,3	1,2	<0,01
Meropenem	15,1	1,8	<0,01

Od ukupnog broja izolata, na ertapenem + imipenem bilo je rezistentno 6,4 % izolata, na ertapenem + meropenem također je bilo rezistentno 6,4 % izolata dok je na sva 3 karbapenema bilo rezistentno ukupno 4,8 % izolata.

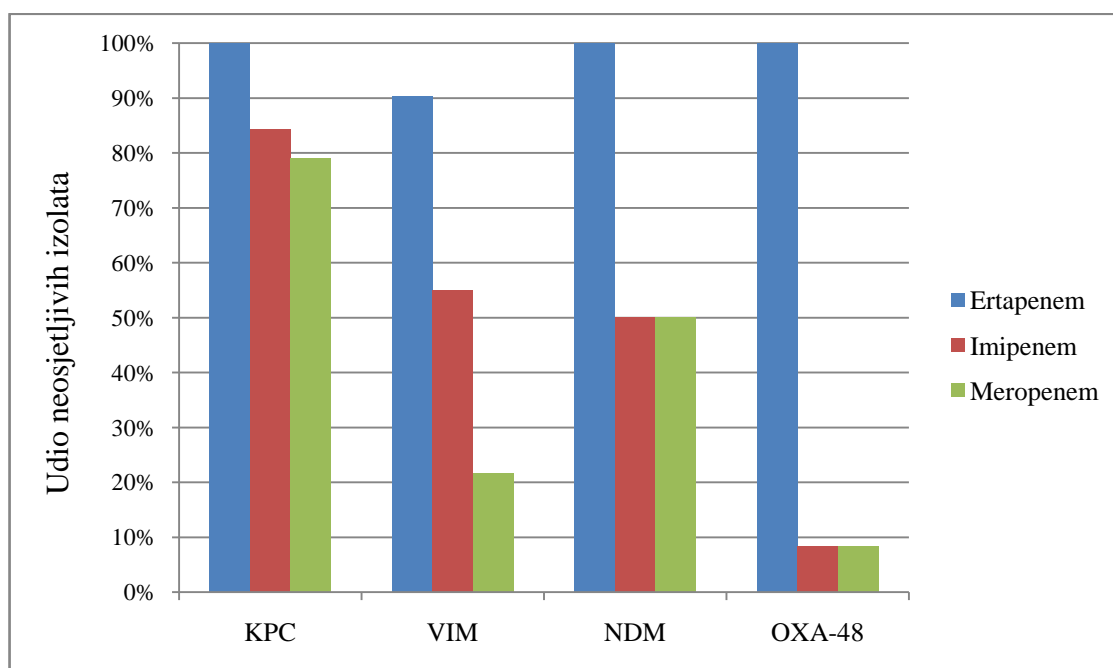
Udio izolata rezistentnih na dva ili više karbapenema bio je veći kod izolata koji proizvode karbapenemaze i iznosio je 16,3 % za kombinaciju ertapenem + imipenem, 15,1% za kombinaciju ertapenem + meropenem odnosno 12,8 % za kombinaciju ertapenem + imipenem + meropenem. Udio rezistentnih izolata na navedene kombinacije karbapenema u izolata koji ne proizvode karbapenemaze iznosi 1,2 % za ertapenem + imipenem, 1,8% za ertapenem + meropenem i 0,6 % za ertapenem + imipenem + meropenem. Navedena razlika je statistički značajna ( $\chi^2$ ,  $p < 0,01$ ) za sve navedene kombinacije karbapenema (Slika 20.).



**Slika 20.** Udio izolata rezistentnih na kombinacije ertapenema, imipenema i meropenema u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze u odnosu na skupinu izolata koji ne proizvode karbapenemaze. ETP– ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem. \*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$  ( $\chi^2$ -test)



Izolati koji su proizvodili karbapenemaze ispoljavali su varijabilan profil rezistencije na karbapeneme ovisno o vrsti karbapenemaze koju proizvode. Niti jedan izolat koji je proizvodio karbapenemaze KPC, NDM i OXA-48 nije bio osjetljiv na ertapenem, no osjetljivost na ertapenem zabilježena je u 10 % izolata koji su proizvodili karbapenemazu VIM. Najveći udio neosjetljivih izolata na imipenem i meropenem zabilježen je u izolata koji proizvode KPC, dok je neosjetljivost na ova dva karbapenema bila najniža u izolata koji proizvode karbapenemazu OXA-48 (Slika 21.).



**Slika 21.** Udio izolata neosjetljivih na ertapenem, imipenem i meropenem s obzirom na karbapenemaze koje proizvode

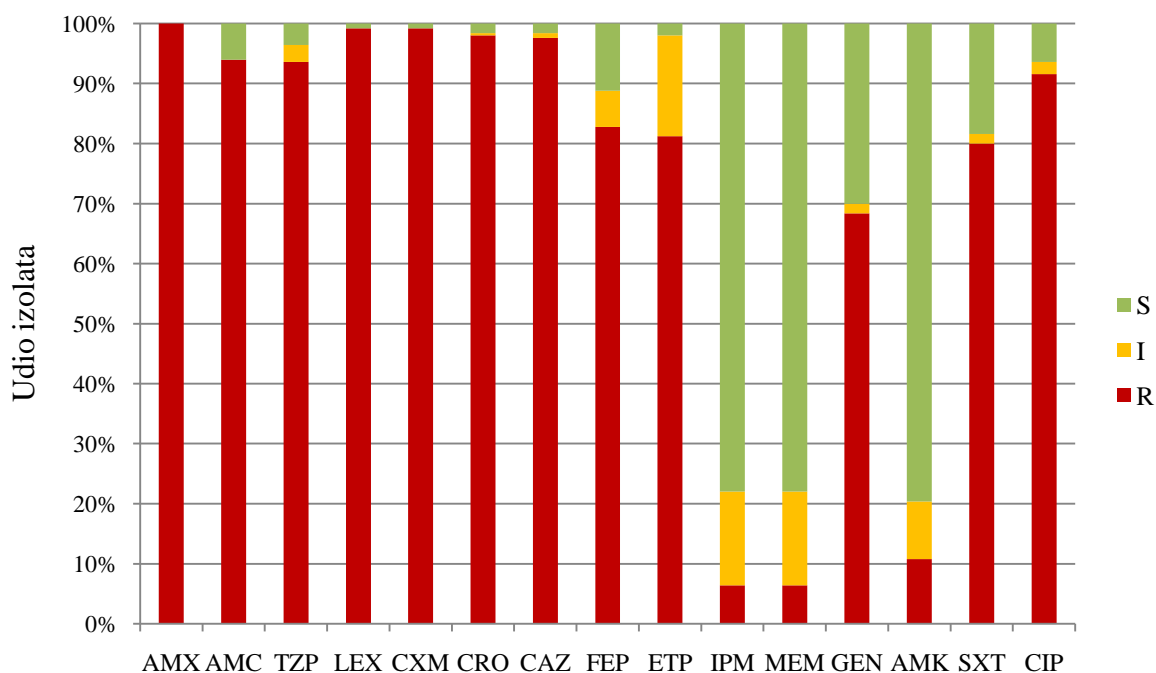
Svi su izolati bili rezistentni na amoksicilin, dok je po 94 % izolata bilo rezistentno na kombinaciju amoksicilina s klavulanskom kiselinom i kombinaciju piperacilina i tazobaktama. Udio izolata rezistentnih na cefalosporine kretao se u rasponu od 99 % za cefaleksin i cefuroksim, 98 % za ceftriakson i ceftazidim te 83 % za cefepim. 91 % izolata bilo je rezistentno na ciprofloksacin dok je 80 % bilo rezistentno na kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola. Za razliku od navedenih antibiotika, rezistencija na aminoglikozide bila je varijabilnija i udio iznosio 68 % za gentamicin, odnosno 11 % za amikacin (Tablica 20., Slika 22.).

**Tablica 20.** Profil rezistencije svih izolata uključenih u studiju

Antibiotik (µg)	Broj izolata			Udio izolata		
	R	I	S	R (%)	I (%)	S (%)
Amoksisicilin	250	0	0	100,0	0,0	0,0
Amoksiklav	235	0	15	94,0	0,0	6,0
Piperacilin/tazobaktam	234	7	9	93,6	2,8	3,6
Cefaleksin	248	0	2	99,2	0,0	0,8
Cefuroksim	248	0	2	99,2	0,0	0,8
Ceftriakson	245	1	4	98,0	0,4	1,6
Ceftazidim	244	2	4	97,6	0,8	1,6
Cefepim	207	15	28	82,8	6,0	11,2
Ertapenem*	203	42	5	81,2	16,8	2,0
Imipenem *	16	39	195	6,4	15,6	78,0
Meropenem*	16	39	195	6,4	15,6	78,0
Gentamicin	171	4	75	68,4	1,6	30,0
Amikacin	27	24	199	10,8	9,6	79,6
Trimetoprim/sulfametoksazol	200	4	46	80,0	1,6	18,4
Ciprofloksacin	229	5	16	91,6	2,0	6,4

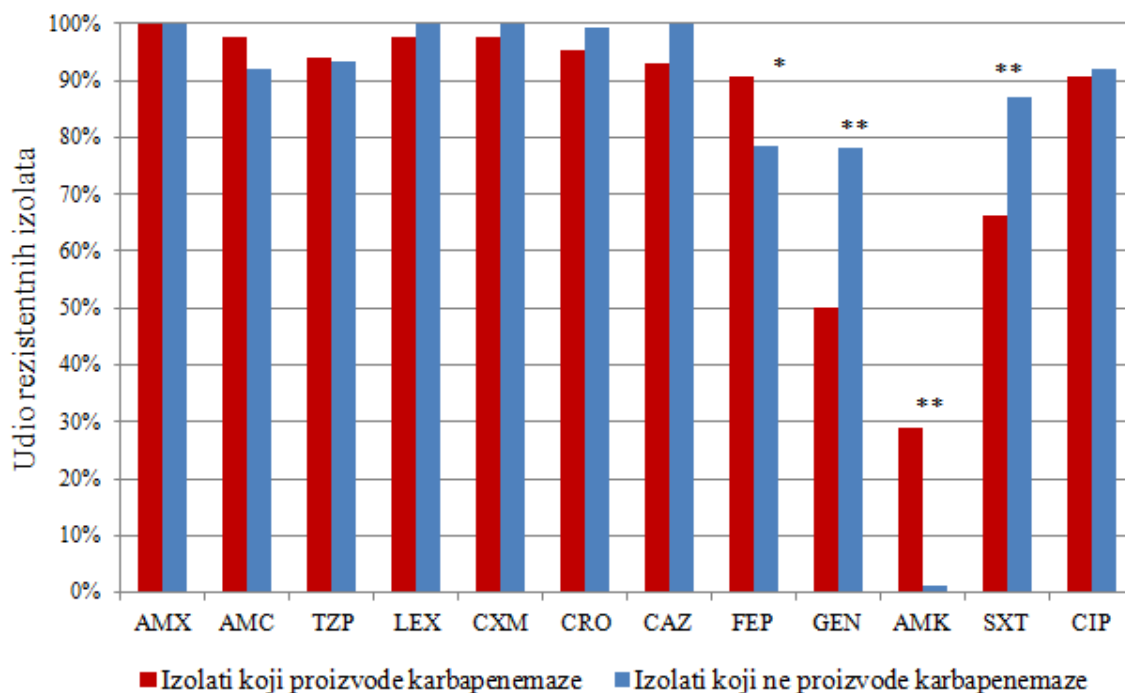
\* Mjereno epsilometarskim testom (E-test)

S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv



**Slika 22.** Profil rezistencije svih izolata uključenih u studiju. AMX – amoksisicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin. S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv

Udio rezistentnih izolata u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze statistički se značajno razlikovao kod cefepima, gentamicina, amikacina i trimetoprim-sulfametoksazola (Slika 23.). Profil rezistencije na testirane antibiotike izolata koji proizvode karbapenemaze i izolata koji ne proizvode karbapenemaze prikazani su u tablicama 21 i 22, odnosno slikama 24 i 25.



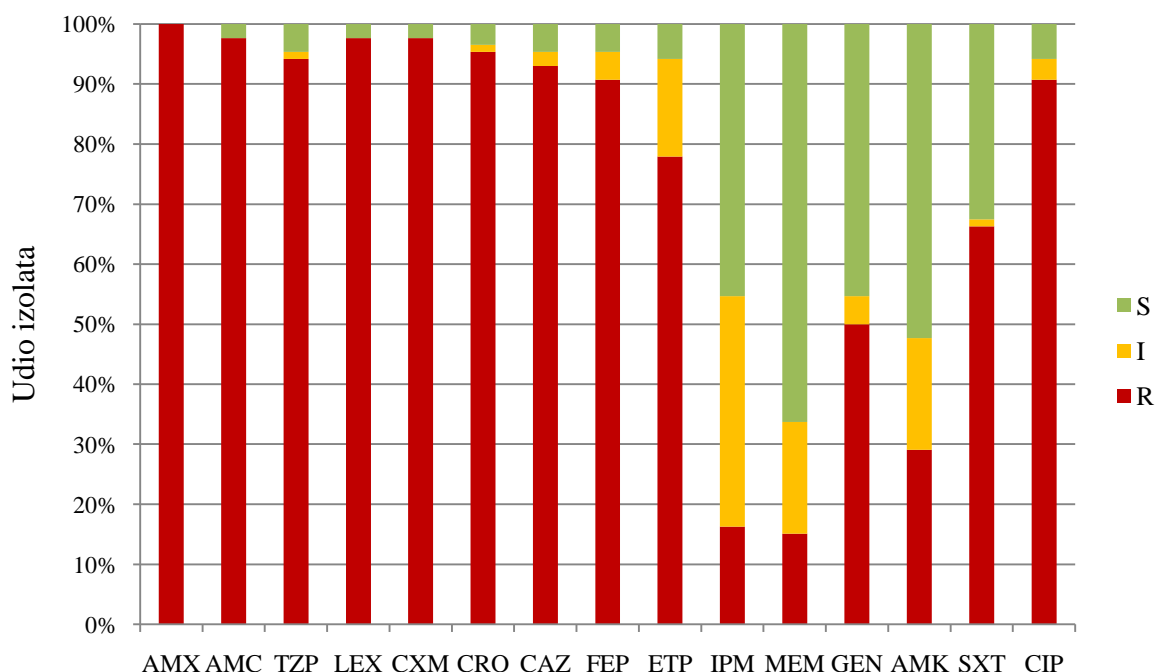
**Slika 23.** Usporedba zastupljenosti rezistentnih izolata na pojedine antibiotike između skupine izolata koji proizvode karbapenemaze i skupine izolata koji ne proizvode karbapenemaze. AMX – amoksisilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin. \*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ , \* - statistička značajnost na razini  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -test)

**Tablica 21.** Profil rezistencije u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze.

Antibiotik (μg)	Broj izolata			Udio izolata		
	R	I	S	R (%)	I (%)	S (%)
Amoksicilin	86	0	0	100,0	0	0
Amoksiklav	84	0	2	97,7	0	2,3
Piperacilin/tazobaktam	81	1	4	94,2	1,2	4,7
Cefaleksin	84	0	2	97,7	0	2,3
Cefuroksim	84	0	2	97,7	0	2,3
Ceftriakson	82	1	3	95,3	1,2	3,5
Ceftazidim	80	2	4	93,0	2,3	4,7
Cefepim	78	4	4	90,7	4,7	4,7
Ertapenem*	67	14	5	77,9	16,3	5,8
Imipenem *	14	33	39	16,3	38,4	45,3
Meropenem*	13	16	57	15,1	18,6	66,3
Gentamicin	43	4	39	50,0	4,7	45,3
Amikacin	25	16	45	29,1	18,6	52,3
Trimetoprim/sulfametoksazol	57	1	28	66,3	1,2	32,6
Ciprofloksacin	78	3	5	90,7	3,5	5,8

\* Mjereno epsilometarskim testom (E-test)

S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv



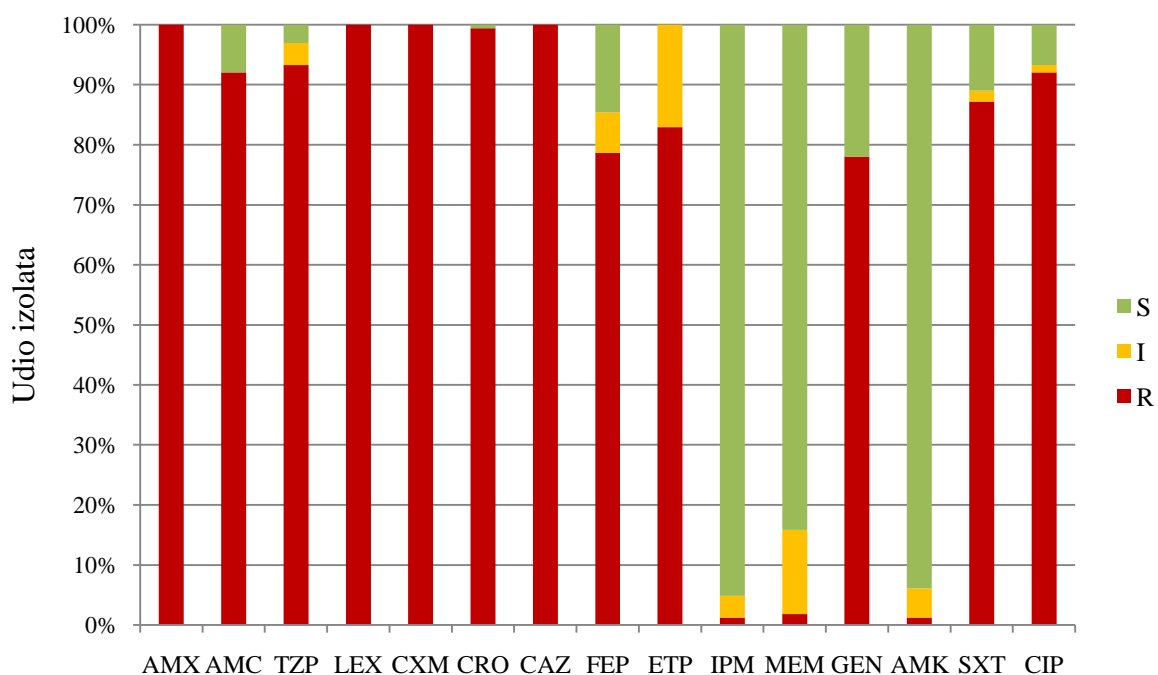
**Slika 24.** Profil rezistencije u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze. AMX – amoksicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin. S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv.

**Tablica 22.** Profil rezistencije u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze.

Antibiotik (µg)	Broj izolata			Udio izolata		
	R	I	S	R (%)	I (%)	S (%)
Amoksicilin	164	0	0	100,0	0	0
Amoksiklav	151	0	13	92,1	0	7,9
Piperacilin/tazobaktam	153	6	5	93,3	3,7	3,0
Cefaleksin	164	0	0	100,0	0	0
Cefuroksim	164	0	0	100,0	0	0
Ceftriakson	163	0	1	99,4	0	0,6
Ceftazidim	164	0	0	100,0	0	0
Cefepim	129	11	24	78,7	6,7	14,6
Ertapenem*	136	28	0	82,9	17,1	0
Imipenem *	2	6	156	1,2	3,7	95,1
Meropenem*	3	23	138	1,8	14,1	84,1
Gentamicin	128	0	36	78,0	0	22,0
Amikacin	2	8	154	1,2	4,9	93,9
Trimetoprim/sulfametoksazol	143	3	18	87,2	1,8	11,0
Ciprofloksacin	151	2	11	92,1	1,2	6,7

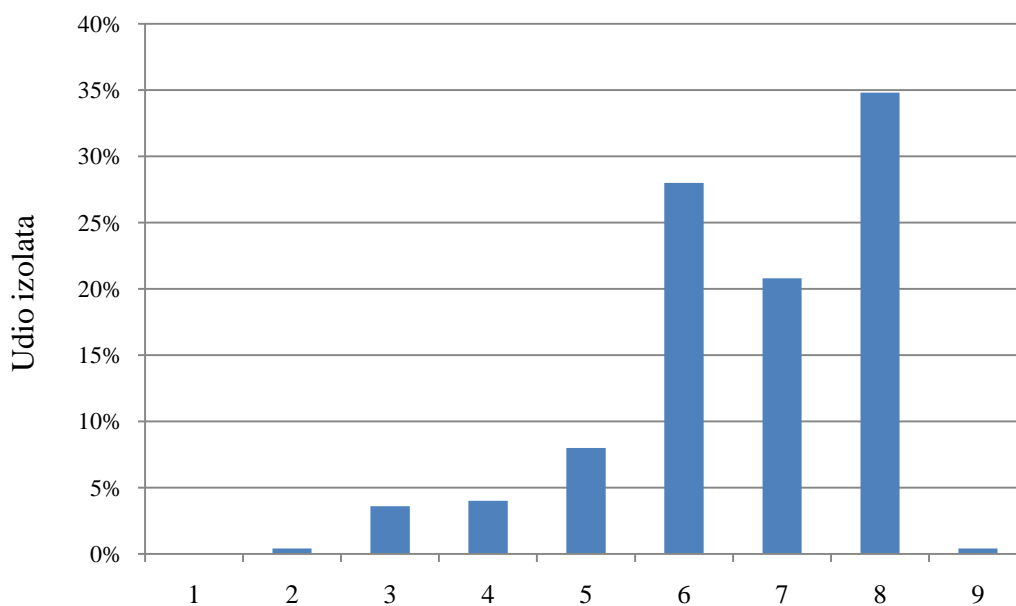
\* Mjereno epsilometarskim testom (E-test)

S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv

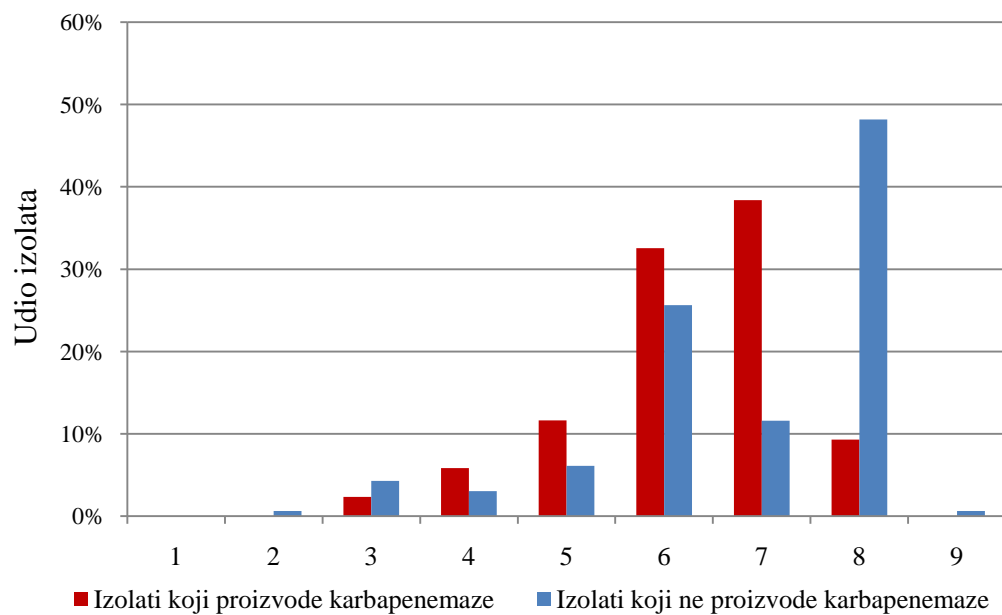


**Slika 25.** Profil rezistencije u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze. AMX – amoksicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin. S – osjetljiv, R – rezistentan, I – intermedijarno osjetljiv.

Od svih izolata uključenih u ovu studiju, 99,6 % zadovoljavalo je kriterij višestruke rezistencije, tj. nisu bili osjetljivi (I+R) na barem jedan antibiotik iz minimalno tri različite klase antibiotika. U procjeni višestruko rezistentnog fenotipa, intrinzička rezistencija na amoksisicilin u izolata *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. i *C. freundii*, rezistencija *Enterobacter* spp. i *C. freundii* na kombinaciju amoksisicilina i klavulanske kiseline, te rezistencija *Enterobacter* spp. i *C. freundii* na cefalosporine prve generacije nisu bile uključene. U ukupnoj populaciji izolata najveći udio izolata činili su izolati koji nisu bili osjetljivi na barem jedan antibiotik iz 8 različitih klasa ispitivanih antibiotika (34,8 %). Izolati koji nisu bili osjetljivi na barem jedan antibiotik iz 6, 7 i 8 različitih klasa antibiotika činili su ukupno 83,6 % izolata (Slika 26.). Samo jedan izolat nije bio osjetljiv na barem jedan antibiotik od svih testiranih klasa antibiotika. U skupini izolata koji proizvode karbapenemaze najviše izolata nije bilo osjetljivo na barem jedan antibiotik iz 6 i 7 različitih klasa antibiotika (ukupno 71 %), dok su u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze, najveći udio činili izolati koji nisu bili osjetljivi na barem jedan od 6 i 8 različitih klasa antibiotika (ukupno 73,8 %) (Slika 27.).



**Slika 26.** Ukupna distribucija izolata prema broju klasa antibiotika na koje izolati nisu ispoljavali osjetljiv fenotip na barem jedan antibiotik.



**Slika 27.** Usporedba distribucije izolata između skupine izolata koji proizvode karbapenemaze i skupine izolata koji ne proizvode karbapenemaze prema broju klasa antibiotika na koje izolati nisu ispoljavali osjetljivi fenotip na barem jedan antibiotik.

#### 4.5. DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENA ZA REZISTENCIJU NA ANTIBIOTIKE

Lančanom reakcijom polimerazom u analiziranih je izolata detektirana prisutnost gena za rezistenciju na 6 različitih klasa antibiotika: beta-laktamaze, aminoglikozid-modificirajući enzimi, plazmidni geni za rezistenciju na kinolone, plazmidne dihidropteroat sintaze, efluks pumpe tet(A) – tet(E) i geni za rezistenciju na kloramfenikol.

Od gena koji kodiraju beta-laktamaze, *bla*<sub>TEM</sub> je detektiran u ukupno 71,6 % izolata, *bla*<sub>SHV</sub> u 62,4 % izolata, te *bla*<sub>CTX-M</sub> u 61,2 % izolata. Geni koji kodiraju plazmidne beta-laktamaze AmpC detektirani su u 2,8 % izolata.

Unutar skupine izolata u kojih je detektiran gen *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> detektiran je u 90 % izolata, dok je u preostalih 10 % detektiran *bla*<sub>TEM-116</sub>. Niti jedna detektirana varijanta gena *bla*<sub>TEM</sub> nije kodirala ESBL enzim. Svi izolati u kojih je detektiran *bla*<sub>TEM-116</sub> koproducirali su karbapenemazu KPC-2. Koprodukcija karbapenemaze KPC-2 i beta-laktamaze TEM-116 uočena u ovom radu objavljena je u studiji Jelić i suradnika iz 2016. godine (28). Prisutnost *bla*<sub>SHV</sub> zabilježena je samo u izolata *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Među izolatima u kojima je zabilježena prisutnost gena *bla*<sub>SHV</sub>, u 79,5 % detektiran je gen *bla*<sub>SHV-11</sub>, dok je varijanta *bla*<sub>SHV-1</sub> detektirana u 17,9 % izolata. Geni koji kodiraju ESBL varijante beta-laktamaze SHV detektirani su u ukupno 4 izolata. U tri je detektiran *bla*<sub>SHV-12</sub>, dok je *bla*<sub>SHV-5</sub> detektiran u jednom izolatu. Svi detektirani geni *bla*<sub>CTX-M</sub> kodirali su varijantu CTX-M-15. Od detektiranih gena *bla*<sub>AmpC</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> detektiran je u samo jednom izolatu *C. freundii*, dok je u preostalih 6 izolata detektiran gen *bla*<sub>ACC</sub>.

Od gena koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime, gen *aac(6')-Ib* detektiran je u 84,8 % izolata, *aph(3')-Ia* u 70,0 %, *aac(3')-II* u 65,2 % izolata, *aadA1* u 47,6 %, *ant2* u 3,2%, *aac(3')-I* u 2 % i *aac(3')-IV* u jednom izolatu.

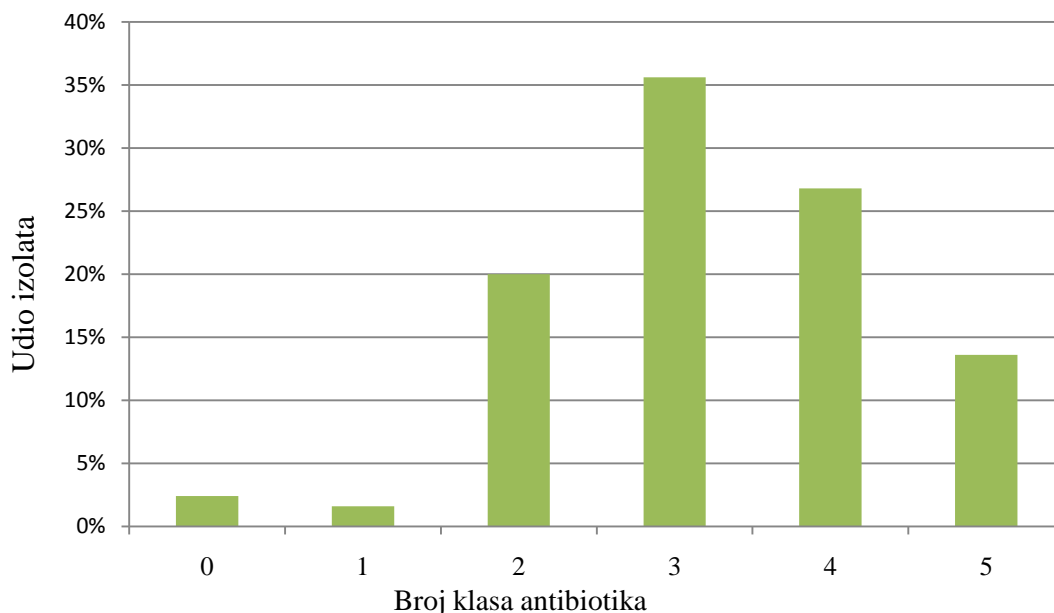
Geni *sul1* i *sul2* koji su odgovorni za rezistenciju na sulfonamide detektirani su u ukupno 81,6 %, odnosno 36,8 % izolata.

Od gena za rezistenciju na tetracikline, gen *tetD* je detektiranu 26,0 % izolata, *tetA* u 20,0 % dok je gen *tetB* detektiran u jednom izolatu. Po učestalosti slijede plazmidni geni za rezistenciju na kinolone, od kojih je *qnrB* detektiran u 16,4 % izolata, *qnrA* u 4,8 % te *qnrS* u 2 %.

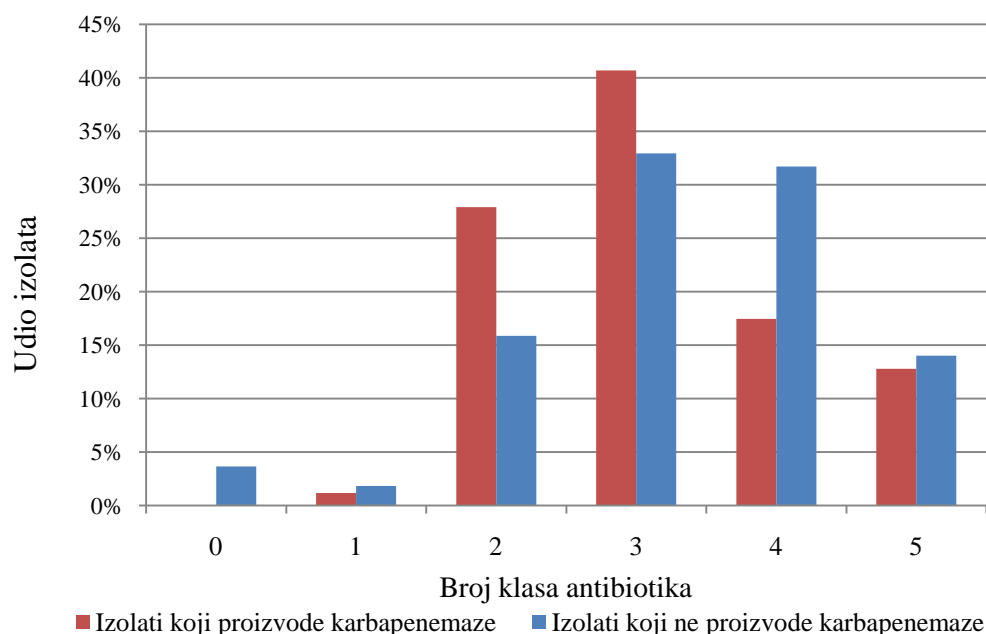
Geni za rezistenciju na kloramfenikol detektirani su u najmanjem broju izolata, od čega je *floR* detektiran u 3,2 % dok je *cmlA* detektiran u 1,6 % izolata.



77 % izolata posjedovalo je gene za rezistenciju na tri ili više različitih klasa antibiotika (Slika 28.). Zastupljenost izolata prema broju klasa antibiotika za koje je detektiran barem jedan gen za rezistenciju u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze prikazana je na slici 29.



**Slika 28.** Distribucija svih izolata po broju klasa antibiotika za koje je detektiran barem jedan gen za rezistenciju. Geni koji kodiraju karbapenemaze nisu uključeni.

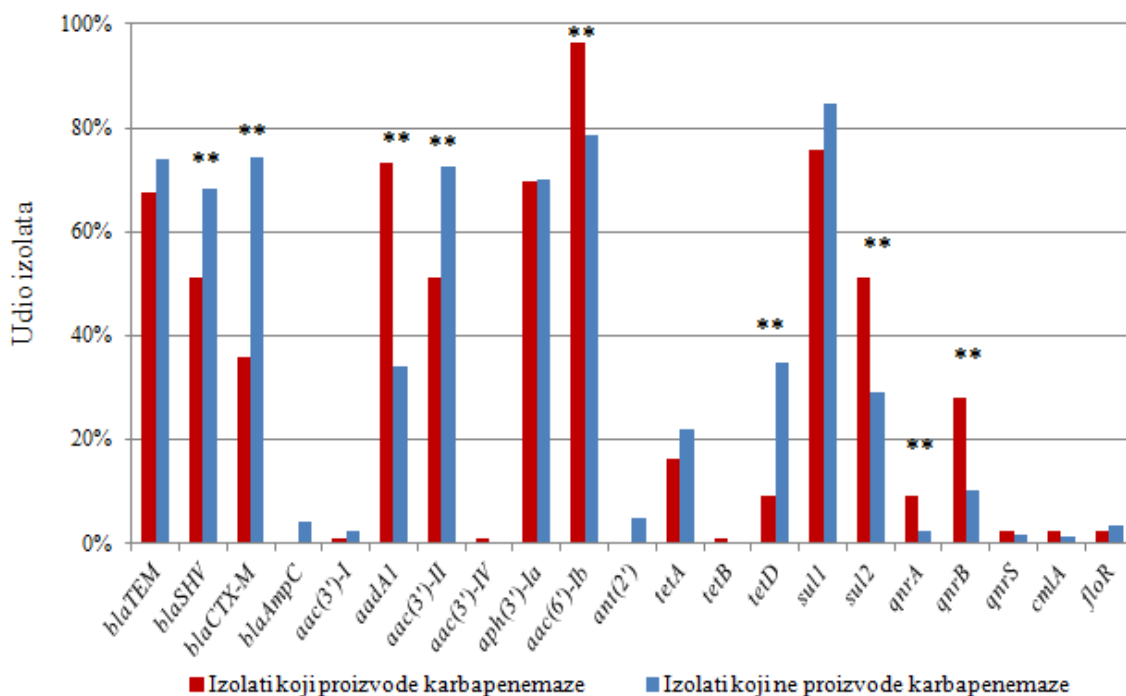


**Slika 29.** Usporedba distribucije izolata između skupine izolata koji proizvode karbapenemaze i skupine izolata koji ne proizvode karbapenemaze po broju klasa antibiotika za koje je detektiran barem jedan gen za rezistenciju. Geni koji kodiraju karbapenemaze nisu uključeni.

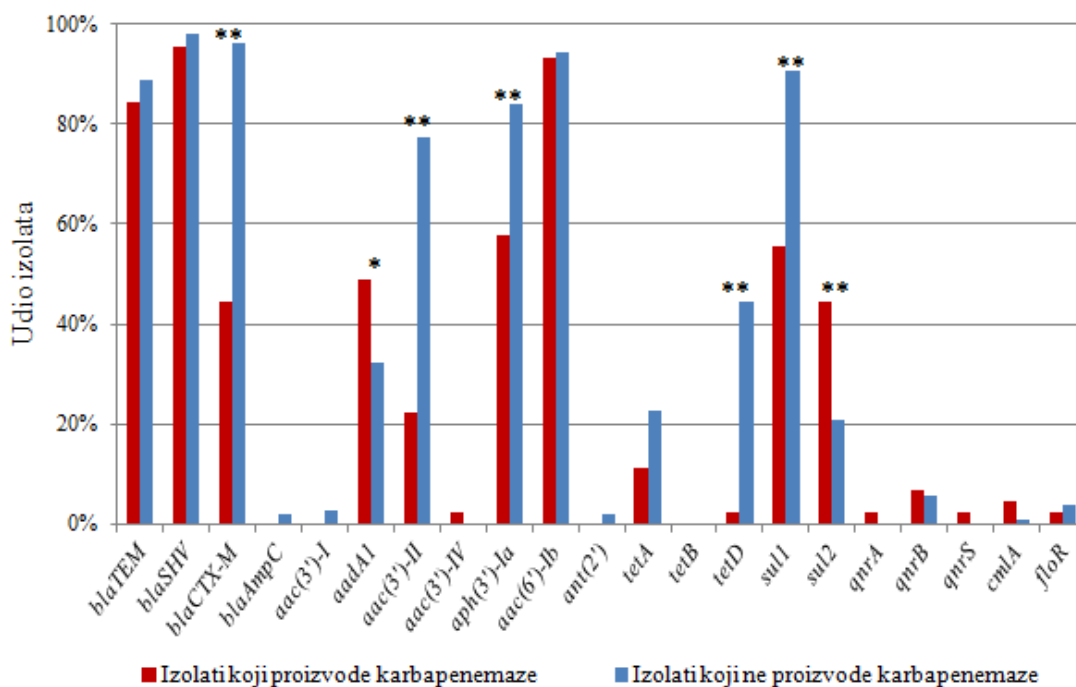
Na razini ukupne populacije, usporedbom skupine izolata koji proizvode karbapenemaze i skupine koja ne proizvodi karbapenemaze, udio izolata u kojima su detektirani geni *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *aac(3')-II* i *tetD* bio je statistički značajno veći u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze dok je udio izolata u kojima su detektirani geni *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *sul2*, *qnrA* i *qnrB* bio statistički značajno veći u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze (Slika 30., Tablica 23.).

U izolata *K. pneumoniae*, udio izolata u kojih su detektirani geni *bla<sub>CTX-M</sub>*, *aac(3')-II*, *aph(3')-Ia*, *tetD* i *sul1* bio je statistički značajno veći u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze dok je udio izolata u kojih su detektirani geni *aadA1* i *sul2* statistički značajno veći u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze (Slika 31., Tablica 24.). U *E. cloacae*, udio izolata u kojih je detektiran gen *bla<sub>SHV</sub>* je statistički značajno veći u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze, dok je udio izolata u kojih su detektirani geni *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *sul1* i *qnrB* veći u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze (Slika 32., Tablica 24.). Štoviše, *aac(6')-Ib* i *aadA1* detektirani su u svim izolatima *E. cloacae* koji proizvode karbapenemaze.

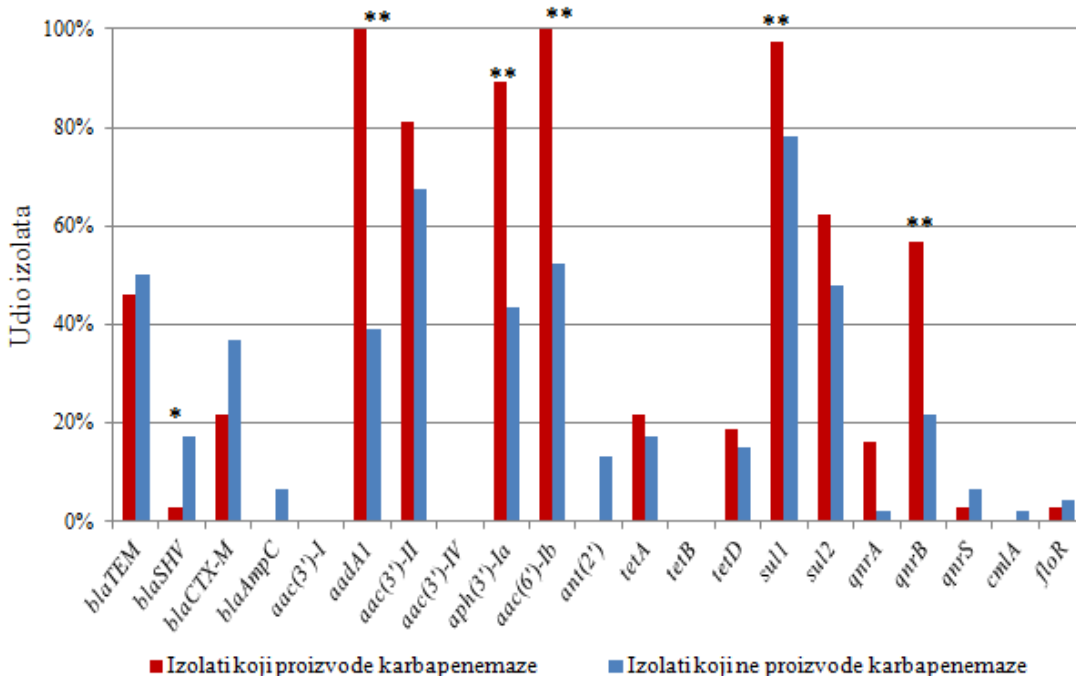
Navedena usporedba na razini vrste nije rađena za izolate *C. freundii*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* i *P. mirabilis* zbog malog broja izolata.



**Slika 30.** Distribucija detektiranih gena za rezistenciju na antibiotike u svih izolata uključenih u rad u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze. \*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$  ( $\chi^2$ -test).



**Slika 31.** Distribucija detektiranih gena za rezistenciju na antibiotike u izolata *K. pneumoniae* u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze. \*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ , \* - statistička značajnost na razini  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -test).



**Slika 32.** Distribucija detektiranih gena za rezistenciju na antibiotike u izolata *E. cloacae* u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze. \*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ , \* - statistička značajnost na razini  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -test).

**Tablica 23.** Geni za rezistenciju na antibiotike koji su detektirani u izolatima uključenima u istraživanje i njihova distribucija u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze.

Gen	Udio u izolatima koji proizvode karbapenemaze (%)	Udio u izolatima koji ne proizvode karbapenemaze (%)	$\chi^2$
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	67,4	73,8	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	51,2	68,3	**
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	36,0	74,4	**
<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	0	4,3	
<i>aac(6')-Ib</i>	96,5	78,7	**
<i>aph(3')-Ia</i>	69,8	70,1	
<i>aac(3')-II</i>	51,2	72,6	**
<i>aadA1</i>	73,3	34,1	**
<i>ant2</i>	0	4,9	
<i>aac(3')-I</i>	1,2	2,4	
<i>aac(3')-IV</i>	1,2	0	
<i>sul1</i>	75,6	84,8	
<i>sul2</i>	51,2	29,3	**
<i>tetD</i>	9,3	34,8	**
<i>tetA</i>	16,3	22,0	
<i>tetB</i>	1,2	0	
<i>qnrB</i>	27,9	10,4	**
<i>qnrA</i>	9,3	2,4	**
<i>qnrS</i>	2,3	1,8	
<i>floR</i>	2,3	3,7	
<i>cmlA</i>	2,3	1,2	

\*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$  ( $\chi^2$ -test)

**Tablica 24.** Geni za rezistenciju na antibiotike koji su detektirani u izolatima *K. pneumoniae* i *E. cloacae* i njihova distribucija u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze.

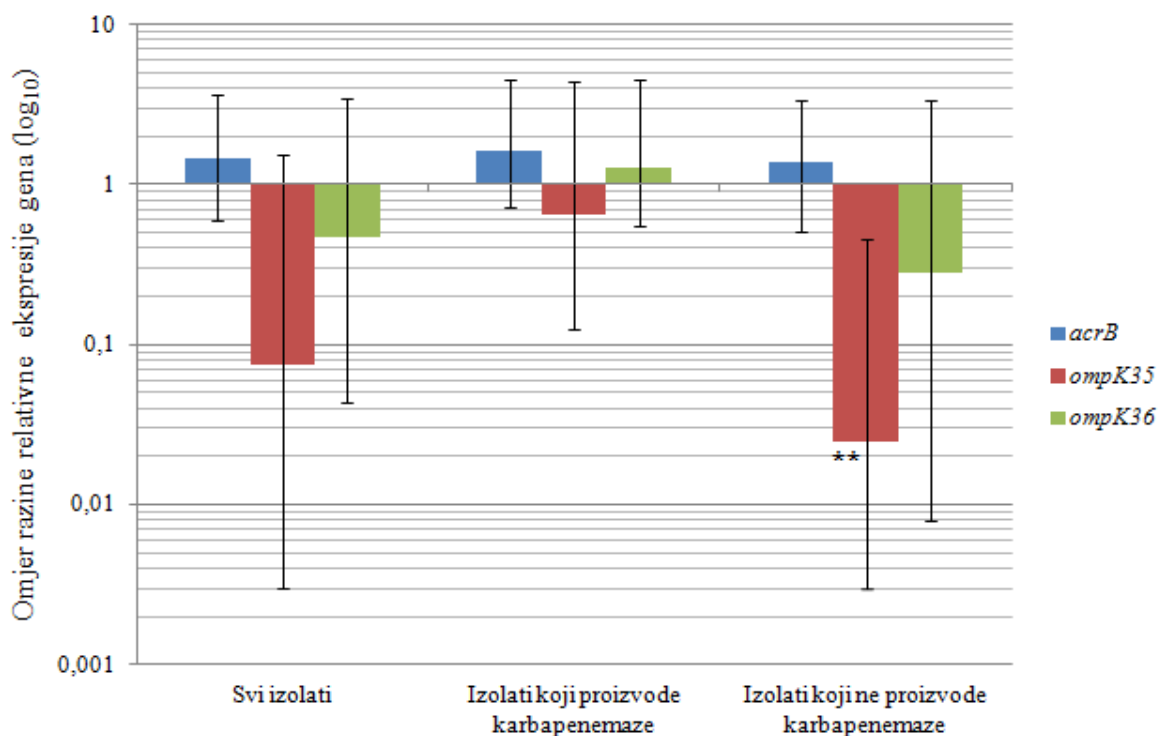
Gen	Izolati <i>K. pneumoniae</i> (%)			Izolati <i>E. cloacae</i> (%)		
	Proizvode karbapenemaze	$\chi^2$	Ne proizvode karbapenemaze	Proizvode karbapenemaze	$\chi^2$	Ne proizvode karbapenemaze
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	84,4		88,7	45,9		50,0
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	95,6		98,1	2,7	*	17,4
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	44,4	**	96,2	21,6		37,0
<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	0		1,9	0		6,5
<i>aac</i> (6')-Ib	93,3		94,3	100	**	52,2
<i>aph</i> (3')-Ia	57,8	**	84,0	89,2	**	43,5
<i>aac</i> (3')-II	22,2	**	77,4	81,1		67,4
<i>aadA1</i>	48,9	*	32,1	100	**	37,0
<i>ant2</i>	0		1,9	0		13,0
<i>aac</i> (3')-I	0		2,8	0		0
<i>aac</i> (3')-IV	2,2		0	0		0
<i>sul1</i>	55,6	**	90,6	97,3	**	76,1
<i>sul2</i>	44,4	**	20,8	62,2		45,7
<i>tetD</i>	2,2	**	44,3	18,9		15,2
<i>tetA</i>	11,1		22,6	21,6		15,2
<i>tetB</i>	0		0	0		0
<i>qnrB</i>	6,7		5,7	56,8	**	21,7
<i>qnrA</i>	2,2		0	5,4		2,2
<i>qnrS</i>	2,2		0	0		6,5
<i>floR</i>	4,4		0,9	0		2,2
<i>cmlA</i>	3,8		2,2	2,7		2,2

\*\* - statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ , \* - statistička značajnost na razini  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -test)

#### 4.6. MJERENJE EKSPRESIJE GENA KOJI KODIRAJU EFLUKS PUMPE I PORINSKE KANALE

Mjerenje razine relativne ekspresije gena koji kodiraju efluks pumpe i porinske kanale provedeno je koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu. Mjerenje je obavljeno u reprezentativnim izolatima *K. pneumoniae*, *E. cloacae* i *E. aerogenes*. Svaki reprezentativni izolat je predstavljao jedan pulsotip iz svake ustanove. U analizu je ukupno uključeno 87 izolata *K. pneumoniae*, 39 izolata *E. cloacae* i 10 izolata *E. aerogenes*. Razina relativne ekspresije u reprezentativnih izolata uspoređena je s razinom relativne ekspresije promatranih gena u izolata iz kontrolnih skupina sačinjenih od izolata divljeg tipa. Kontrolne skupine sadržavale su 30 izolata *K. pneumoniae*, 16 izolata *E. cloacae* odnosno 4 izolata *E. aerogenes*.

U izolata *K. pneumoniae*, statistički značajna razlika zabilježena je samo u relativnoj ekspresiji gena *ompK35*. Razina relativne ekspresije gena *ompK35* bila je snižena u testnoj skupini koju sačinjavaju svi analizirani izolati *K. pneumoniae* i u testnoj skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze. Relativna ekspresija gena *ompK35* bila je 13,5 puta niža u skupini izolata koji obuhvaća sve analizirane izolate *K. pneumoniae*, dok je u testnoj skupini koja obuhvaća samo izolate koji ne proizvode karbapenemaze relativna ekspresija *ompK35* bila 40 puta niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 33.). Razina relativne ekspresije gena *ompK35* u testnoj skupini izolata koji proizvode karbapenemaze bila je 1,5 puta niža od kontrolne skupine, no bez statističke značajnosti. Detektirana razlika u razini relativne ekspresije gena *acrB* i *ompK36* nije bila statistički značajna, iako je razina relativne ekspresije gena *acrB* bila povećana, a *ompK36* snižena u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 33.).

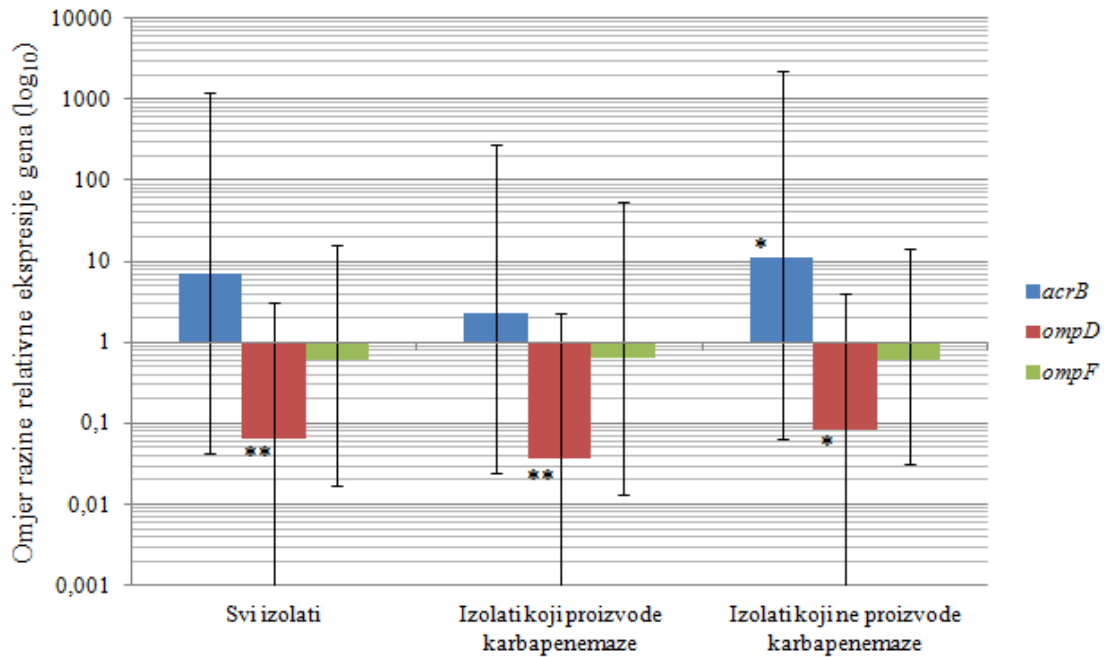


**Slika 33.** Omjer relativne razine ekspresije gena *acrB*, *ompK35* i *ompK36* i pripadajuće standardne pogreške srednjih vrijednosti analiziranih izolata u usporedbi s kontrolnom skupinom u *K. pneumoniae*. Podatci su dobiveni koristeći REST 2009. \*\* -statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ .

U izolata *E. cloacae*, statistički značajna razlika zabilježena je u razini relativne ekspresije gena *acrB* i *ompC*. Razina relativne ekspresija gena *acrB* bila je povećana u testnoj skupini izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze. U odnosu na kontrolnu skupinu razina relativne ekspresija gena *acrB* bila je 11,34 puta veća ( $p < 0,05$ ) (Slika 34.). Razina relativne ekspresije gena *acrB* u skupini koju sačinjavaju svi analizirani izolati *E. cloacae* i izolati koji proizvode karbapenemaze bila je povećana s obzirom na kontrolnu skupinu bez uočene statističke značajnosti.

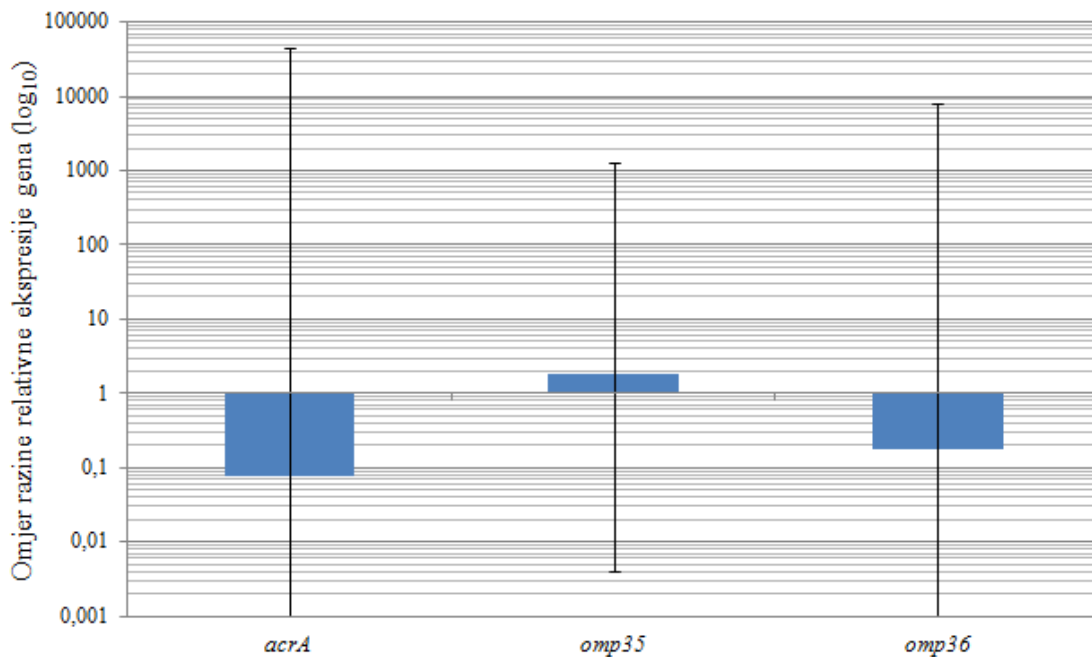
Razina relativne ekspresije gena *ompC* u izolata *E. cloacae* bila je snižena u odnosu na kontrolnu skupinu. Razina relativne ekspresija bila je snižena u testnoj skupini koju sačinjavaju svi analizirani izolati *E. cloacae*, skupini koju čine samo izolati koji proizvode karbapenemaze i u skupini koju čine izolati koji ne proizvode karbapenemaze. Razina relativne ekspresije gena *ompC* u testnoj skupini koju sačinjavaju svi analizirani izolati *E. cloacae* bila je 15,6 puta niža ( $p < 0,01$ ), u skupini koju sačinjavaju izolati koji proizvode karbapenemaze razina relativne ekspresija je bila 27 puta niža ( $p < 0,01$ ) dok je u grupi koju sačinjavaju izolati koji ne proizvode karbapenemaze, razina relativne ekspresije gena bila 12 puta niža ( $p < 0,05$ ) (Slika 34.). Razina relativne ekspresije gena *ompF* u testnim skupinama

nije se statistički značajno razlikovala od razine relativne ekspresije u kontrolnoj skupini iako je bila snižena (Slika 34.).



**Slika 34.** Omjer relativne razine ekspresije gena *acrB*, *ompD* i *ompF* i pripadajuće standardne pogreške srednjih vrijednosti analiziranih izolata u usporedbi s kontrolnom skupinom u *E. cloacae*. Podatci su dobiveni koristeći REST 2009. \*\* -statistička značajnost na razini  $p < 0,01$ , \* - statistička značajnost na razini  $p < 0,05$ .

U izolata *E. aerogenes* nije zamijećena statistički značajna razlika u razini relativne ekspresije gena *acrA*, *omp35* i *omp36* u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 35.).



**Slika 35.** Omjer relativne razine ekspresije gena *acrA*, *omp35* i *omp36* i pripadajuće standardne pogreške srednjih vrijednosti analiziranih izolata u usporedbi s kontrolnom skupinom u *E. aerogenes*. Podatci su dobiveni koristeći REST 2009.



## 4.7. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA

### 4.7.1. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA U IZOLATIMA KOJI PROIZVODE KARBAPENEMAZE

Broj i veličina plazmida određeni su koristeći S1-PFGE analizu u svih 86 izolata koji proizvode karbapenemaze. U svih analiziranih izolata detektirana je prisutnost od jednog do šest plazmida čija se veličina kretala u rasponu od ~50 do ~350 kb.

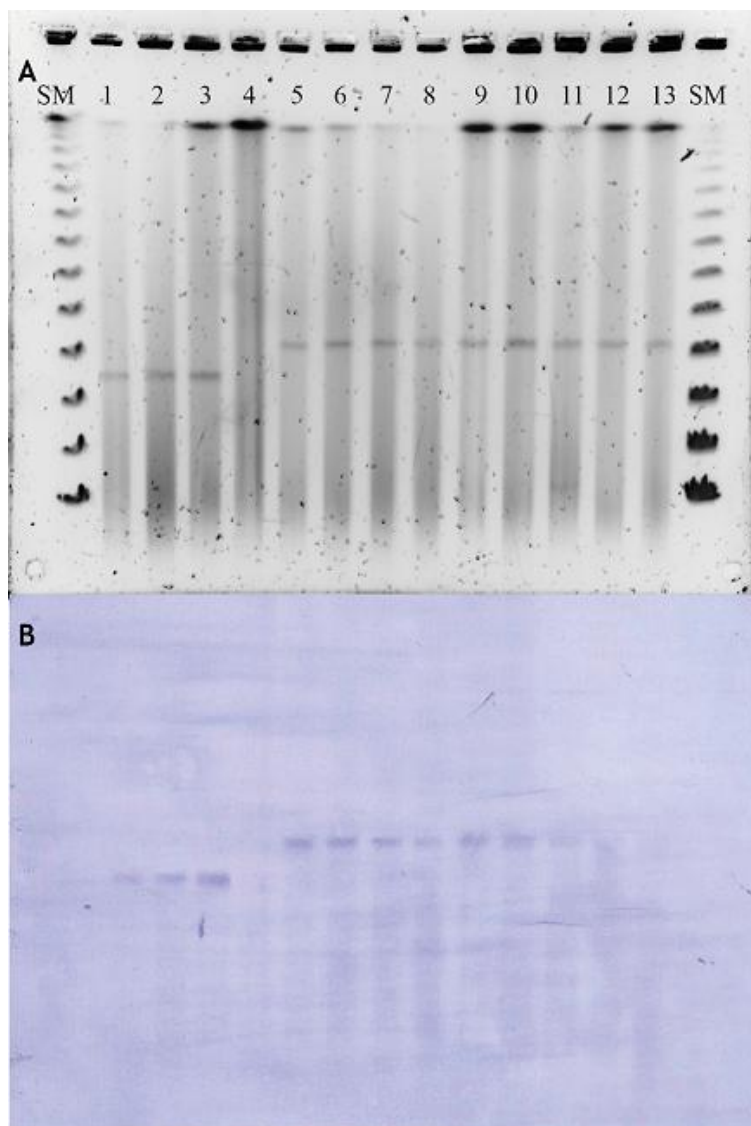
Od ukupno 86 izolata koji proizvode karbapenemaze, plazmidni smještaj gena koji kodiraju karbapenemaze uspješno je detektiran u njih 82 (95,3 %).

U izolata koji su proizvodili karbapenemazu VIM detektirano je od jednog do šest plazmida čija se veličina kretala u rasponu od ~50 do ~350 kb. Varijacija u broju plazmida i njihovoj veličini primijećena je na razini bakterijske vrste, pa čak i među izolatima koji spadaju u iste pulsotipove ili klonske tipove. Uniformnost S1-PFGE profila plazmida zabilježena je samo u 15 izolata *E. cloacae* koji spadaju u EC-A1 i u 8 izolata koji spadaju u EC-C1 (Tablica 25.). Southern hibridizacijom utvrđeno je da se gen *bla<sub>VIM</sub>* u svim VIM-producirajućim izolatima nalazi na samo jednom plazmidu čija veličina varira od ~50 do ~340kb. U četiri izolata, nije bilo moguće odrediti veličinu plazmida *bla<sub>VIM</sub>* hibridizacijom po Southernu. U izolata *E. cloacae*, najzastupljeniji je bio plazmid *bla<sub>VIM</sub>* veličine 180 kb koji je detektiran u svih izolata iz PFGE grupe EC-A, odnosno klonskom tipu ST92. Plazmid *bla<sub>VIM</sub>* veličine ~200 kb detektiran je u svim izolatima PFGE grupe EC-C, odnosno klonskom tipu ST200 (Slika 36.). Plazmidi *bla<sub>VIM</sub>* veličine ~300 kb detektirani su u 4 od 7 izolata iz PFGE grupe F (ST105). Plazmidi veličine ~50 kb, ~70 kb, ~290 kb i ~340 kb detektirani su u pojedinačnim izolatima *E. cloacae*. Plazmidi *bla<sub>VIM</sub>* u izolata vrsta *C. freundii*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* bili su različitih veličina, koja je varirala od izolata do izolata (Tablica 25.).

**Tablica 25.** S1-PFGE profili plazmida i veličina plazmida koji nose gen *bla<sub>VIM</sub>* u izolatima koji proizvode karbapenemazu VIM.

Vrsta	Pulsotip	MLST	Broj izolata	S1-PFGE profil (~kb)	<i>bla<sub>VIM</sub></i> (~kb)
<i>C. freundii</i>	CF-A1	-	1	110, 60, 50	ND
<i>E. aerogenes</i>	EA-G	-	1	310, 90, 70	310
<i>E. cloacae</i>	EC-F1	ST105	1	310, 120, 80, 50	50
	EC-M	ST100	1	350, 70	70
	EC-A1	ST92	1	220, 180	180
	EC-A1	ST92	1	200, 180	180
	EC-A1	ST92	1	180, 50, 45	180
	EC-A1	ST92	15	180	180
	EC-A2	ST92	1	180	180
	EC-C1	ST200	8	200	200
	EC-C2	ST200	1	200	200
	EC-F3	ST105	1	290, 150, 50	290
	EC-F1	ST105	1	300, 150, 120, 80, 50	300
	EC-F1	ST105	1	300, 110, 100, 80	300
	EC-F1	ST105	1	300, 290, 150, 90	300
	EC-F2	ST105	1	300, 80, 50	300
	EC-F1	ST105	1	340, 320, 90, 50	340
	EC-F1	ST105	1	290, 80	ND
<i>K. oxytoca</i>	-	-	1	200, 150	150
<i>K. pneumoniae</i>	KP-G	NT	1	220, 50	50
	KP-D1	ST15	3	240, 110, 90, 70, 60, 50	90
	KP-H	ST248	1	100	100
	KP-D3	ST15	1	190, 170, 150, 110, 60, 50	170
	KP-D2	ST15	2	180, 110, 60, 50	180
	KP-I	NT	1	180	180
	KP-D4	ST15	1	150, 110, 60, 50	ND
	KP-D5	ST15	1	170, 110, 60, 50	ND
Ukupno: 51 izolat					

ND – nije detektiran



**Slika 36.** (A) plazmidni profili u VIM-1-producirajućih izolata *E. cloacae* dobiveni metodom S1-PFGE. SM – standard molekularnih masa „CHEF DNA Size Standard“, 1 – 3 – *E. cloacae* ST92, 4 – negativna kontrola *E. coli* A15R, 5 – 13 – *E. cloacae* ST200. Gel slikan pod UV-svjetlošću. (B) Pripadajuća najlonska membrana nakon hibridizacije po Southernu s VIM-1 hibridizacijskom sondom obilježenom digoksigeninom. Slikano pod vidljivom svjetlošću.

U izolata koji su proizvodili karbapenemazu OXA-48 uočen je heterogeni plazmidni S1-PFGE profil, sačinjen od dva do četiri plazmida, koji je varirao među izolatima istog pulsotipa i klonskog tipa. Hibridizacijom po Southernu, gen *bla*<sub>OXA-48</sub> u svim izolatima detektiran je na plazmidima veličine ~60 kb (Tablica 26., Slika 37.). Rezultati karakterizacije plazmida u OXA-48-producirajućim izolatima *K. pneumoniae* analiziranim u ovom radu objavljeni su u studiji Jelić i suradnika iz 2017. godine (32).

**Tablica 26.** S1-PFGE profili plazmida i veličina plazmida koji nose gen *bla*<sub>OXA-48</sub> u izolatima koji proizvode karbapenemazu OXA-48 .

Vrsta	Pulsotip	MLST	Broj izolata	S1-PFGE profil (~kb)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (~kb)
<i>K. pneumoniae</i>	KP-C2	ST16	1	220,60,50	60
	KP-C2	ST16	1	60,50	60
	KP-C3	ST16	1	220,60,50	60
	KP-C3	ST16	1	190,60,50	60
	KP-C3	ST16	1	190,60	60
	KP-C4	ST16	1	220,60,50	60
	KP-C4	ST16	1	190,60,50	60
	KP-E1	ST15	2	220,70,60	60
	KP-E3	ST528	1	180,60,50	60
	KP-M	ST37	1	150,100,80,60	60
KP-R	ST1418	1	220,80,60	60	
Ukupno: 12 izolata					

U izolata koji su proizvodili karbapenemazu NDM detektirana su dva do tri plazmida veličine od ~50 do ~340 kb, a hibridizacijom po Southernu utvrđeno je da se gen *bla*<sub>NDM</sub> također nalazi na samo jednom plazmidu čija je veličina varirala od izolata do izolata (Tablica 27.).

**Tablica 27.** S1-PFGE profili plazmida i veličina plazmida koji nose gen *bla*<sub>NDM</sub> u izolatima koji proizvode karbapenemazu NDM .

Vrsta	Pulsotip	MLST	Broj izolata	S1-PFGE profil (~kb)	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> (~kb)
<i>C. freundii</i>	B	-	1	320,110,80	110
<i>K. pneumoniae</i>	F	ST15	1	340,290,50	340
	F	ST15	1	300,290,50	50
	C1	ST16	1	210, 200	200
Ukupno: 4 izolata					

Izolati koji su proizvodili karbapenemazu KPC imali su jedan do dva plazmida veličine od ~50 do ~210 kb. Hibridizacijom po Southernu, gen *bla*<sub>KPC</sub> detektiran je na plazmidima čija se veličina kreće u navedenom rasponu od čega je plazmid *bla*<sub>KPC</sub> veličine ~160 kb bio detektiran u 79% izolata (Tablica 28.). Rezultati karakterizacije plazmida u KPC-2-producirajućim izolatima *K. pneumoniae* analiziranim u ovom radu objavljeni su u studiji Jelić i suradnika iz 2016. godine (28).

**Tablica 28.** S1-PFGE profili plazmida i veličina plazmida koji nose gen *bla*<sub>KPC</sub> u izolatima koji proizvode KPC karbapenemazu

Vrsta	Pulsotip	MLST	Broj izolata	S1-PFGE profil (~kb)	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> (~kb)
<i>K. pneumoniae</i>	B2	ST258	1	60,210	60
	B1	ST258	14	160	160
	B1	ST258	2	180	180
	B1	ST258	1	210	210
	B1	ST258	1	160	160
Ukupno: 19 izolata					

#### 4.7.2. KARAKTERIZACIJA PLAZMIDA U TRANSKONJUGATIMA

Od 86 izolata koji proizvode karbapenemaze, horizontalni prijenos gena za rezistenciju na karbapeneme, konjugacijom s *E. coli* A15R, uspješno je izvršen kod 33 izolata (38,4%). Horizontalni prijenos bio je uspješan kod svih 12 izolata koji proizvode karbapenemazu OXA-48. Od izolata koji proizvode karbapenemazu NDM, konjugacija je uspješno provedena s njih 3 (75%), dok je konjugacija bila uspješna u 7 (37%) izolata koji proizvode KPC. Konjugacija je rezultirala transkonjugatima kod 11 izolata (22%) koji proizvode karbapenemazu VIM.

Transkonjugati *E. coli* A15 R koji su preuzeli gene karbapenemaza amblerove klase A i B bili su rezistentni na ampicilin, ko-amoksiklav, piperacilin/tazobaktam i na sve cefalosporine (Tablica 29., Tablica 31., Tablica 32.). Rezistencija na karbapeneme ovakvih transkonjugata bila je varijabilna. Svi NDM-1 transkonjugati *E. coli* A15R ispoljavali su identičan profil rezistencije na karbapeneme koji je uočen u donorskim izolatima. Smanjena osjetljivost na ertapenem zabilježena je kod svih NDM-1 *E. coli* A15R transkonjugata, dok je rezistencija na imipenem i meropenem zabilježena kod samo jednog transkonjugata (Tablica 29.). Profil rezistencije VIM-1 transkonjugata *E. coli* A15R na karbapeneme razlikovao se od onog uočenog u donorskih izolata. 63,6% VIM-1 transkonjugata *E. coli* A15R nije bilo osjetljivo na ertapenem, dok je neosjetljivost na imipenem zabilježena u 27,3% transkonjugata. Smanjena osjetljivost na meropenem nije zabilježena niti u jednom transkonjugatu VIM-1 *E. coli* A15R (Tablica 31.). Svi KPC-2 transkonjugati *E. coli* A153 bili su rezistentni na ertapenem, 57,12% transkonjugata nije bilo osjetljivo na imipenem, dok je neosjetljivost na meropenem zabilježena u 71,4% transkonjugata (Tablica 32.).

Kotransfer rezistencije na gentamicin s genom  $bla_{NDM-1}$  zabilježen je samo u jednom transkonjugatu iako su sva tri donorska NDM-1 izolata bila rezistentna na ovaj antibiotik (Tablica 29.). Kotransfer rezistencije na gentamicin nije zabilježen niti u jednom VIM-1 i KPC-2 transkonjugatu (Tablica 31., Tablica 32.). Sva tri donorska NDM-1 izolata bila su rezistentna na trimetoprim-sulfametoksazol, no prijenos rezistencije na ovaj antibiotik zabilježen je u dva NDM-1 transkonjugata (Tablica 29.). Kotransfer rezistencije na trimetoprim-sulfametoksazol zabilježen je u 8 transkonjugata iako je rezistencija na ovaj antibiotik zabilježena u 10 VIM-1 donorskih izolata koji su uspješno prenijeli gen  $bla_{VIM-1}$  (Tablica 31.). Rezistencija na gentamicin i trimetoprim-sulfametoksazol nije zabilježena niti u jednom KPC-2 transkonjugatu *E. coli* A15R (Tablica 32.). Rezistencija na amikacin i ciprofloksacin nije zabilježena niti u jednom KPC-2, NDM-1 i VIM-1 transkonjugatu

(Tablica 29., Tablica 31., Tablica 32.). Svi OXA-48 transkonjugati *E. coli* A15R bili su rezistentni na ampicilin, ko-amoksiklav i piperacilin/tazobaktam. Rezistencija na karbapeneme bila je varijabilna. Svi OXA-48 transkonjugati bili su neosjetljivi na ertapenem, svi su bili osjetljivi na imipenem, dok je neosjetljivost na meropenem zabilježena kod samo jednog OXA-48 transkonjugata. Kotransfer rezistencije na ostale klase antibiotika, uključujući cefalosporine, nije zabilježen (Tablica 30.).

S1-PFGE analizom transkonjugata i hibridizacijom prema Southernu ustanovljeno je da svi dobiveni transkonjugati imaju samo jedan plazmid, na kojem se ujedno nalazi i gen za karbapenemazu. Veličina plazmida koji nose gen za karbapenemazu bila je jednaka u transkonjugatima i odgovarajućim donorskim izolatima. Svi OXA-48 transkonjugati imali su jedan plazmid veličine ~60 kb (Tablica 30., Slika 37.). Veličina plazmida koji nosi gen *bla*<sub>VIM</sub> u VIM transkonjugatima kretala se od ~50 do ~220 kb (Tablica 31.), gen *bla*<sub>NDM</sub> detektiran je na plazmidima veličine ~50 do ~200 kb u NDM transkonjugatima (Tablica 29.) dok je gen *bla*<sub>KPC</sub> detektiran na plazmidima veličine ~160 i ~180 kb u KPC transkonjugatima (Tablica 32.).

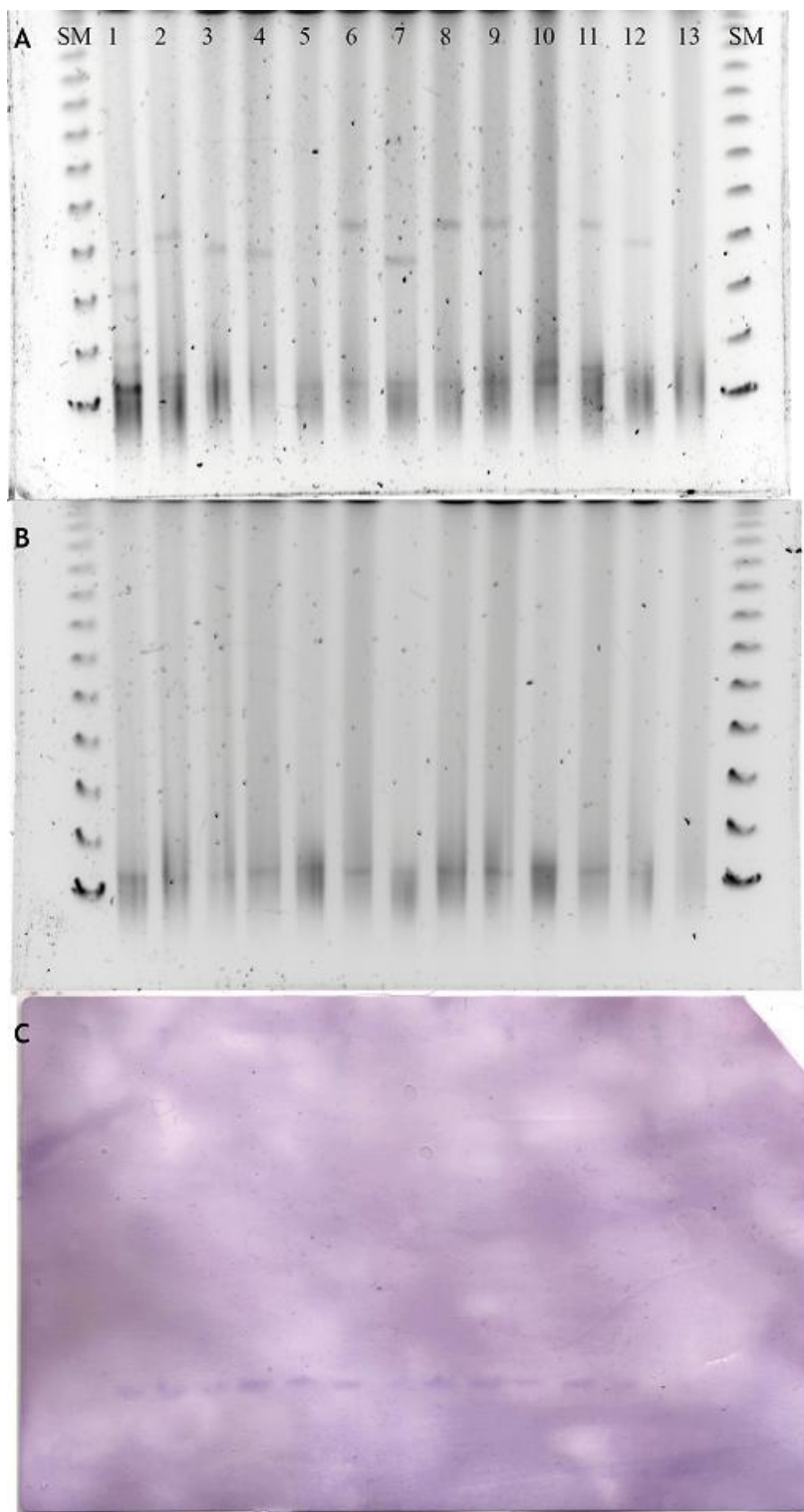
Klasifikacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti koristeći PBRT analizu uspješno je provedena u ukupno 16 transkonjugata u kojih su detektirani plazmidi koji nose gen *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> odnosno *bla*<sub>KPC</sub>. Skupina inkompatibilnosti plazmida uspješno je utvrđena za plazmide *bla*<sub>NDM</sub> u sva tri NDM transkonjugata i svrstani su u tri različite skupine inkompatibilnosti – IncA/C, IncR i IncL/M (Tablica 29.). Od 11 VIM transkonjugata, plazmide je bilo moguće klasificirati u njih 6, od kojih su IncN i incL/M plazmidi detektirani u po tri transkonjugata. Svi IncN plazmidi imali su ~50 kb dok je veličina IncL/M plazmida iznosila ~90kb (Tablica 31.). Plazmidi koji nose gen *bla*<sub>KPC</sub> spadali su u IncFIIs skupinu inkompatibilnosti u svim KPC transkonjugatima (Tablica 32.). Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem smještaj gena *bla*<sub>KPC</sub> na plazmidima IncFIIs skupine inkompatibilnosti opisan je u studiji Jelić i suradnika iz 2016. godine (28).

Klasifikaciju plazmida u OXA-48 izolatima nije bilo moguće izvršiti koristeći standardnu PBRT analizu. Plazmid koji nosi gen *bla*<sub>OXA-48</sub> svrstan je u IncL/M skupinu u svih 12 OXA-48 transkonjugata koristeći dodatne početnice za detekciju IncL/M plazmida preuzetu iz studije Poirel i suradnika (Tablica 30.) (123).

U transkonjugata OXA-48, kotransfer gena koji kodiraju ostale gene za rezistenciju na antibiotike nije zabilježen i lančanom reakcijom polimerazom, uz *bla*<sub>OXA-48</sub> nije detektiran niti jedan drugi gen (Tablica 30.). Smještaj gena *bla*<sub>OXA-48</sub> na plazmidu IncL/M veličine ~60 kb koji ne nosi dodatne gene za rezistenciju na antibiotike objavljen je, na temelju rezultata ovog

istraživanja, u studiji Jelić i suradnika iz 2017. godine (32). U svih VIM transkonjugata, uz *bla*<sub>VIM</sub>, detektirani su geni *aadA1*, *aac(6')-Ib* i *sul1* dok su geni *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *tetA*, *sul2*, *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* detektirani sporadično, nevezano i neovisno o skupini inkompatibilnosti u koju plazmid pripada (Tablica 31.). Svi su NDM transkonjugati, uz gen *bla*<sub>NDM</sub>, nosili gene *aadA1* i *aac(6')-Ib* dok su *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *aac(3')-I*, *aac(3')-II*, *aph(3')-Ia*, *sul1*, *sul2*, *qnrA*, *tetA*, *cmlA* i *floR* detektirani sporadično, nevezano i neovisno o skupini inkompatibilnosti u koju plazmid pripada (Tablica 29.). U svih je KPC transkonjugata zabilježena prisutnost gena *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> i *aph(3')-Ia* (Tablica 32.).





**Slika 37.** (A) plazmidni profili u OXA-48-producirajućih izolata *K. pneumoniae* dobiveni metodom S1-PFGE. (B) plazmidni profili u odgovarajućim OXA-48 transkonjugatima *E. coli* A15R. (C) Pripadajuća najlonska membrana sa S1-PFGE gela OXA-48 transkonjugata *E. coli* A15R nakon hibridizacije po Southernu s OXA-48 hibridizacijskom sondom obilježenom digoksigeninom. SM – standard molekularnih masa „CHEF DNA Size Standard“, 1 – 12 – (A) OXA-48-producirajući izolati / (B) transkonjugati, 13 – negativna kontrola *E. coli* A15R, (A i B) - gel slikan pod UV-svjetlošću. (C) – slikano pod vidljivom svjetlošću

**Tablica 29.** Fenotipske i genotipske karakteristike *E. coli* A15R NDM transkonjugata i odgovarajućih donorskih izolata.

Transkonjugati				
Transkonjugat	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> (~kb)	Inc grupa	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
112/T2	200	A/C	<i>aac(6')-Ib, aadA1, aph(3')-Ia, tetA, sul1, sul2, cmlA, floR</i>	AMX, AMC, TZP, LEX, CXM, CRO, CAZ, FEP, ETP, SXT
188/T1	110	L/M	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(6')-Ib, aac(3')-I, aadA1, aac(3')-II, sul1</i>	AMX, AMC, TZP, LEX, CXM, CRO, CAZ, FEP, ETP, IPM (I), MEM (I), GEN, SXT
85/T1	50	R	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(6')-Ib, aadA1</i>	AMX, AMC, TZP, CXM, CRO, LEX, CAZ, FEP, ETP (I)
Klinički izolati				
Donor	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> (~kb)	S1-PFGE (kb)	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
112/E	200	210, 200	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(6')-Ib, aadA1, aph(3')-Ia, tetA, sul1, sul2, cmlA, floR</i>	AMX, AMC, TZP, LEX, CXM, CRO, CAZ, FEP, ETP, GEN, SXT, CIP
188/E	110	320, 110, 80	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(6')-Ib, aac(3')-I, aadA1, aac(3')-II, tetA, sul1</i>	AMX, AMC, TZP, LEX, CXM, CRO, CAZ, FEP, ETP, IPM, MEM, GEN, SXT
85/E	50	300, 290, 50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(6')-Ib, aadA1, sul1, sul2, qnrB</i>	AMX, AMC, TZP, LEX, CXM, CRO, CAZ, FEP, ETP (I), GEN, SXT, CIP

AMX – amoksicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin.; (I) – intermedijerno osjetljiv

**Tablica 30.** Fenotipske i genotipske karakteristike *E. coli* A15R OXA-48 transkonjugata i odgovarajućih donorskih izolata.

Transkonjugati				
Transkonjugat	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (~kb)	Inc grupa	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
233/T1	60	L/M	geni za rezistenciju, osim <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> nisu detektirani	AMX, AMC, TZP, ETP
245/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
251/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
255/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
279/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
283/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP (I)
314/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
356/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP
364/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP (I), ETP
376/T2	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP (I)
408/T2	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP (I),
471/T1	60	L/M		AMX, AMC, TZP, ETP, MEM (I)
Klinički izolati				
Donor	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> (~kb)	S1-PFGE (~kb)	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
233/E	60	220,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,SXT,CIP
245/E	60	180,60,50	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	AMX, AMC, TZP, ETP(I)
251/E	60	60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP (I),ETP,SXT,CIP
255/E	60	190,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ, FEP,ETP,SXT,CIP
279/E	60	220,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,SXT,CIP
283/E	60	220,70,60	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(3')-II</i> , <i>tetA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,GEN,CIP
314/E	60	220,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,SXT,CIP
356/E	60	220,70,60	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac(3')-II</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP(I),GEN,SXT(I),CIP
364/E	60	220,80,60	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>tetD</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,ETP,SXT
376/E	60	190,60	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,SXT,CIP
408/E	60	150,100,80,60	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>qnrB</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,FEP(I),ETP,SXT,CIP
471/E	60	190,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,ETP,IPM(I),MEM (I),SXT,CIP

AMX – amoksicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetopriom/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin.; (I) – intermedijarno osjetljiv

**Tablica 31.** Fenotipske i genotipske karakteristike *E. coli* A15R VIM transkonjugata i odgovarajućih donorskih izolata.

Transkonjugati				
Transkonjugat	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> (~kb)	Inc grupa	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije*
384/T1	220		<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP (I),IPM (I), SXT
152/T1	200		<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP
199/T16	180		<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,SXT
424/T1	180		<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP
468/T1	180		<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO (I),CAZ,FEP,SXT
166/T28	90	L/M	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC, LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP, SXT
239/T5	90	L/M	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP (I),LEX,CXM,CRO (I),CAZ,FEP
483/T1	90	L/M	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), SXT
169/T20	50	N	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrS</i>	AMX,AMC ,LEX,CXM,CRO,CAZ
432/T1	50	N	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP (I),IPM (I),,SXT
63/T1	50	N	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrB</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP (I), IPM (I)
Klinički izolati				
Donor	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> (~kb)	S1-PFGE (kb)	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije*
384/E	220	180,50,45	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>sul1</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	AMX,AMC,TZP (I),LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN,AMK (I),SXT,CIP
152/E	200	200	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aph</i> (3')-Ia, <i>sul1</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I),MEM (I),GEN (I), CIP
199/E	180	180	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>sul1</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I),MEM (I),GEN, SXT,CIP
424/E	180	180	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN,AMK,SXT,CIP
468/E	180	180	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>sul1</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN,AMK (I),SXT,CIP
166/E	90	240,110,90,70,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC, LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN, SXT,CIP
239/E	90	240,110,90,70,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP, SXT,CIP
483/E	90	240,110,90,70,60,50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN, SXT,
169/E	50	220,5	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>qnrS</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP (I), SXT,CIP (I)
432/E	50	300,290, 150, 90	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (3')-II, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>tetA</i> , <i>tetD</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>qnrA</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I), GEN,AMK (I),SXT,CIP
63/E	50	310, 120, 80, 50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aadA1</i> , <i>aph</i> (3')-Ia, <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>qnrB</i>	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP, GEN,AMK (I),SXT,CIP

\* - Za kratice antibiotika pogledati tablice 29, 30 i 32.

**Tablica 32.** Fenotipske i genotipske karakteristike *E. coli* A15R KPC transkonjugata i odgovarajućih donorskih izolata.

Transkonjugati				
Transkonjugat	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> (~kb)	Inc grupa	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
339/T1	180	FIIs	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aph</i> (3')-Ia	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM
380/T1	180	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM
163/T2	160	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP
324/T1	160	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I),MEM (I)
325/T3	160	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM
328/T1	160	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP
366/T1	160	FIIs		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP ,MEM
Klinički izolati				
Donor	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> (~kb)	S1-PFGE (kb)	Ostali geni za rezistenciju	Profil rezistencije
339/E	180	180	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>aph</i> (3')-Ia	AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM,AMK,CIP
380/E	180	180		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM,AMK,CIP
163/E	160	160		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,AMK,CIP
324/E	160	160		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I),MEM (I),AMK (I),CIP
325/E	160	160		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM,MEM,AMK,CIP
328/E	160	160		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,AMK (I),CIP
366/E	160	160		AMX,AMC,TZP,LEX,CXM,CRO,CAZ,FEP,ETP,IPM (I),MEM,AMK,CIP

AMX – amoksicilin, AMC – amoksiklav, TZP – piperacilin/tazobaktam, LEX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CRO – ceftriakson, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetopriom/sulfametoksazol, CIP – ciprofloksacin.; (I) – intermedijarno osjetljiv

## **5. RASPRAVA**

U ovom radu analizirana je zbirka izolata sačinjena od svih kliničkih izolata enterobakterija prikupljenih u periodu od 1.1.2011. - 31.12.2012. godine koji su ispoljavali smanjenu osjetljivost na karbapeneme. Izolati su prikupljeni u sklopu redovitog djelovanja Nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike pri Odboru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Akademije medicinskih znanosti Hrvatske. Zbirku je činilo ukupno 250 jedinstvenih (eng. „non-copy“) izolata što znači da je svaki izolat iz kolekcije dolazio od različitog pacijenta. Prikupljene izolate karakterizirao je varijabilni profil rezistencije na karbapeneme. Smanjena osjetljivost na ertapenem zabilježena je u gotovo svih analiziranih izolata, dok je smanjena osjetljivost na imipenem, odnosno meropenem uočena u značajno manjem udjelu izolata - 22%.

Širenje enterobakterija otpornih na karbapeneme tijekom 2011. i 2012. godine obuhvatilo je gotovo cijelo područje Republike Hrvatske na što upućuje činjenica da su izolati enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme prikupljeni iz 22 mikrobiološka laboratorija, smještena u 15 gradova. Iako je smanjena osjetljivost na karbapeneme uočena u 6 različitih vrsta enterobakterija, *K. pneumoniae* (60,4 %) i *E. cloacae* (33,2 %) prepoznate su kao dominantne bakterijske vrste odgovorne za širenje rezistencije.

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem vidljivo je da proizvodnja karbapenemaza nije bila dominantan mehanizam rezistencije na karbapeneme. Iako je u znanstvenoj literaturi proizvodnja karbapenemaza opisana kao najefikasniji mehanizam rezistencije na karbapeneme u enterobakterija, geni koji kodiraju karbapenemaze detektirani su u svega 34,4 % analiziranih izolata. U analiziranim izolatima detektirana je proizvodnja četiri klinički najznačajnije karbapenemaze (VIM-1, KPC-2, OXA-48 i NDM-1) iz tri različite klase beta-laktamaza prema Amblerovoj klasifikaciji.

Karbapenemaza VIM-1 detektirana je u najvećem broju izolata koji proizvode karbapenemaze (59,3 %), no ova je karbapenemaza ujedno detektirana i u najvećem broju bakterijskih vrsta. Prema zastupljenosti slijede KPC-2 (22,1 %), OXA-48 (14 %) i NDM-1 (4,7 %). KPC-2 i OXA-48 identificirane su samo u izolata *K. pneumoniae*. Visok stupanj povezanosti karbapenemaze KPC-2 s vrstom *K. pneumoniae* često se opisuje u znanstvenoj literaturi što je posljedica sprege gena *bla<sub>KPC</sub>* i visoko rizičnog klona *K. pneumoniae* ST258 (25). Uzevši u obzir da su Italija i Grčka endemske zemlje KPC-producirajuće *K. pneumoniae*, širenje ove karbapenemaze u Hrvatskoj je, tijekom 2011. i 2012. godine, bilo prilično ograničenog dosega (36). OXA-48 se u znanstvenoj literaturi uglavnom veže uz vrstu *K. pneumoniae*, no zbog horizontalnog širenja plazmida na kojem se *bla<sub>OXA-48</sub>* nalazi, vrlo su česti opisi ove karbapenemaze i u drugim vrstama enterobakterija (65). Valja naglasiti da su

inicijalni opisi karbapenemaza KPC i OXA-48 vezani upravo uz *K. pneumoniae* (36). U ovom radu, karbapenemaza VIM-1 identificirana je u izolata *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* i *C. freundii*, dok je NDM-1 detektirana u izolata *K. pneumoniae* i *C. freundii*. Šarolikost bakterijskih vrsta enterobakterija u kojima su detektirani geni  $bla_{VIM-1}$  i  $bla_{NDM-1}$  u skladu je s literaturnim navodima i posljedica je povezanosti ovih gena s plazmidima koji imaju velik potencijal širenja u različite bakterijske vrste (56). VIM-1 bila je jedina karbapenemaza identificirana u izolata *E. cloacae*. Ovo zapažanje se često navodi u literaturi, pogotovo na području južne Europe i Azije, pri čemu je pojavnost VIM-1-producirajućih *E. cloacae* u Europi najveća u Italiji, Španjolskoj i Grčkoj (135, 136). U izolata *K. pneumoniae* detektirana je proizvodnja sve četiri karbapenemaze. Širok spektar karbapenemaza koje su detektirane u *K. pneumoniae* povezan je s učestalim horizontalnim prijenosom gena koji je specifičan za ovu bakterijsku vrstu (24). Iako je u cijeloj zbirci analiziranih izolata detektirana prisutnost četiri različite karbapenemaze, niti jedan izolat nije proizvodio više od jedne karbapenemaze.

Prisutnost karbapenemaza u izolata enterobakterija analiziranih u ovom radu upućuje na zaključak da ni područje Republike Hrvatske nije pošteđeno globalnog trenda širenja enterobakterija koje proizvode karbapenemaze. Ovaj zaključak ne iznenađuje, pogotovo ako imamo na umu da su dvije države u blizini Republike Hrvatske, Italija i Grčka, prepoznate kao endemske zemlje VIM-1 i KPC-2-producirajućih enterobakterija, da je regija Balkana prepoznata kao sekundarni rezervoar NDM-1-producirajućih enterobakterija i da je cijelo Sredozemlje zahvaćeno epidemijom OXA-48-producirajućih enterobakterija (30, 54, 137). Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem hipoteza H1 „Smanjena osjetljivost na karbapeneme u enterobakterija u Hrvatskoj najčešće nije posredovana proizvodnjom karbapenemaza.“ se prihvaća.

Iako je u analiziranim izolatima detektiran šarolik spektar karbapenemaza, većina izolata ispoljavala je smanjenu osjetljivost na karbapeneme mehanizmima koji ne uključuju proizvodnju ovih enzima. Kao što se često navodi u literaturi, mehanizmi koji ne uključuju proizvodnju karbapenemaza uglavnom utječu na antibakterijsku aktivnost ertapenema, pri čemu imipenem i meropenem uglavnom ostaju pošteđeni (4, 38). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem također upućuju na istovjetni zaključak. U skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze niti jedan izolat nije bio osjetljiv na ertapenem, no udio izolata koji nisu bili osjetljivi na imipenem, odnosno meropenem bio je značajno niži u usporedbi sa skupinom sačinjenom od izolata koji su proizvodili karbapenemaze.



Relativno velike dimenzije i negativni naboj molekula ertapenema čine ovaj antibiotik vrlo osjetljivim na promjene u propusnosti vanjske membrane enterobakterija jer dovode do smanjenja koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici. U uvjetima snižene koncentracije ertapenema u bakterijskoj stanici, ESBL enzimi i/ili beta-laktamaze AmpC, čija je hidrolitička aktivnost marginalna ali ipak prisutna, uspješno inaktiviraju ovaj antibiotik prije nego li dosegne optimalnu koncentraciju za ispoljavanje antibakterijskog djelovanja (138).

Gledajući ukupnu populaciju analiziranih izolata, čak je 2 % bilo osjetljivo na ertapenem, tj. nije pokazivalo znakove smanjene osjetljivosti niti na jedan testirani karbapenem. Neovisno o tome uključeni su u rad jer je u njih detektirana proizvodnja karbapenemaze VIM-1. Varijabilna osjetljivost VIM-1-producirajućih enterobakterija na karbapeneme u uvjetima *in vitro* do sada je opisana u velikom broju znanstvenih radova. Bez obzira na to što karbapenemaza VIM-1 efikasno hidrolizira širok spektar beta-laktamskih antibiotika, od penicilina do cefalosporina proširenog spektra, hidrolitička aktivnost ovih enzima u slučaju karbapenema često varira što rezultira pojavom osjetljivog fenotipa u uvjetima *in vitro*. Varijabilnost hidrolitičke aktivnosti karbapenemaze VIM-1 u slučaju ertapenema i imipenema varira od izolata do izolata neovisno o klonskoj pozadini izolata, a pojava rezistentnog fenotipa u uvjetima *in vitro* često ovisi o dodatnim mehanizmima rezistencije, poput smanjene propusnosti bakterijske stanice za antibiotike (72). Uz smanjenu propusnost, poznato je da razina ekspresije gena *bla<sub>VIM-1</sub>*, broj kopija gena *bla<sub>VIM-1</sub>* u bakterijskoj stanici i mutacije u promotorskoj regiji ovog gena značajno doprinose razvoju rezistencije (136, 139, 140). Uz navedeno, bitnu ulogu igra bakterijska vrsta i inokulum, s obzirom da je u literaturi utvrđena pozitivna korelacija između broja nasadenih bakterijskih stanica i pojave rezistentnog fenotipa (72, 141). Sastav hranjivih podloga na kojima se provodi testiranje osjetljivosti na antibiotike i fenotipski testovi također utječu na ispoljavanje rezistencije na karbapeneme u VIM-1 izolata pri čemu je koncentracija cinkovih iona prepoznata kao bitan faktor (142). Nekonzistentno ispoljavanje rezistencije na karbapeneme u enterobakterija koje proizvode karbapenemaze uvelike otežava njihovu detekciju i identifikaciju što nerijetko rezultira „pritajenim širenjem“. Granična i često varijabilna rezistencija koja se, unatoč proizvodnji karbapenemaza, javlja u enterobakterijama jedan je od glavnih faktora koji su doprinijeli efikasnom početnom širenju KPC-producirajuće *K. pneumoniae* u SAD-u tijekom 1996. godine i VIM-producirajuće *K. pneumoniae* u Grčkoj (26).

Unatoč zapaženoj osjetljivosti na karbapeneme koja je zabilježena među 10% VIM-1-producirajućih izolata, rezistencija na karbapeneme bila je izraženija u skupini izolata koji su

proizvodili karbapenemaze. Iako niti jedan izolat iz skupine koji ne proizvode karbapenemaze nije bio osjetljiv na ertapenem, zastupljenost izolata rezistentnih na više od jednog karbapenema bila je veća u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze i kretala se u rasponu od 16% za ertapenem i imipenem, 15,1% ertapenem i meropenem i 12,8% za kombinaciju sva tri karbapenema. Udio izolata rezistentnih na navedene kombinacije karbapenema u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze bio je značajno manji i kretao se u rasponu od 1,8 – 0,6% za navedene kombinacije. Navedeni rezultati u skladu su s literaturnim zapažanjima koja redovito opisuju ovakav profil rezistencije u enterobakterija koje rezistenciju ne ispoljavaju proizvodnjom karbapenemaza. S druge strane, izolati koji proizvode karbapenemaze redovito pokazuju veću stopu rezistencije i na meropenem i imipenem baš zbog tog jer hidrolitički spektar karbapenemaza obuhvaća sve karbapeneme (4, 8, 23).

Višestruka rezistencija karakteristična je za izolate enterobakterija koji pokazuju smanjenu osjetljivost, odnosno rezistenciju na karbapeneme (12). Skoro svi izolati uključeni u ovaj rad ispoljavali su višestruko-rezistentan fenotip, tj. 99,6 % ih nije bilo osjetljivo na barem jedan antibiotik iz 3 ili više različitih klasa. Uz varijabilnu rezistenciju na karbapeneme, uočena je visoka stopa rezistencije na sve klase testiranih beta-laktamskih antibiotika kao i fluorokinolone i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola. Rezistencija na aminoglikozide također je zabilježena, no bila je varijabilnija pri čemu je rezistencija na gentamicin zabilježena u 68,4 % izolata, dok je na amikacin bilo rezistentno 10,8 %. Višestruka rezistencija koja je uočena kod gotovo svih analiziranih izolata redovito se spominje u brojnim studijama koje se bave karakterizacijom izolata enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme neovisno o mehanizmu rezistencije na karbapeneme (12, 36). U pregledu literature uočljiva je uniformnost profila rezistencije ovakvih izolata što se primarno očituje kroz vrlo visoku stopu rezistencije na peniciline, kombinaciju penicilina i inhibitora beta-laktamaza, cefalosporine prve i druge generacije i cefalosporine proširenog spektra (8, 24). Rezistencija na ciprofloksacin i kombinaciju trimetoprima i sulfonamida također se opisuje u literaturi kao i varijabilna priroda rezistencije na aminoglikozide, pri čemu je, kao i u ovom radu, rezistencija na gentamicin u odnosu na amikacin učestalija (8, 143, 144).

Zastupljenost rezistencije na pojedine antibiotike među izolatima iz skupine koji ne proizvode karbapenemaze i među izolatima koji proizvode karbapenemaze bila je podjednaka za sve analizirane ne-karbapenemske antibiotike, osim u slučaju cefepima, gentamicina, amikacina i kombinacije trimetoprima i sulfametoksazola. Udio rezistentnih izolata na cefepim i amikacin bio je veći u izolatima koji proizvode karbapenemaze, dok je udio izolata

rezistentnih na gentamicin i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola bio veći u izolata koji ne proizvode karbapenemaze. Veća osjetljivost izolata koji ne proizvode karbapenemaze na cefepim posljedica je njegove zwitterionske prirode koja mu omogućuje lakšu penetraciju kroz porinske kanale, a za razliku od ostalih cefalosporina proširenog spektra uspješnije odolijeva hidrolizi beta-laktamazama proširenog spektra (145).

Rezultati analize gena za rezistenciju molekularno-biološkim metodama bili su u skladu s rezultatima testiranja osjetljivosti izolata na antibiotike. Ovo zapažanje upućuje na zaključak da je višestruka rezistencija, uočena u analiziranih izolata, posljedica prisutnosti velikog broja gena za rezistenciju na različite klase antibiotika. Iako su izolati koji pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme često rezistentni na više klasa beta-laktamskih antibiotika, njihovoj višestruko rezistentnoj prirodi doprinosi i širok spektar gena za rezistenciju na antibiotike koji ne spadaju u klasu beta-laktama (8, 12, 56). U čak 77 % izolata analiziranih u ovom radu detektirani su geni za rezistenciju na tri ili više različitih klasa antibiotika. Od detektiranih gena, najzastupljeniji su bili geni za rezistenciju na beta-laktamske antibiotike i aminoglikozide, tj. geni koji kodiraju beta-laktamaze i aminoglikozid-modificirajuće enzime. Prisutnost velikog broja različitih gena za rezistenciju zajednička je karakteristika svih izolata smanjene osjetljivosti na karbapeneme i navedena zapažanja u skladu su s postojećom znanstvenom literaturom na globalnoj razini.

Proizvodnja beta-laktamaza najznačajniji je mehanizam rezistencije na beta-laktamske antibiotike u enterobakterija, što je vidljivo i iz rezultata dobivenih u ovom radu (76). U analiziranim izolatima detektirana je prisutnost širokog spektra gena koji kodiraju različite beta-laktamaze, uključujući karbapenemaze, beta-laktamaze proširenog spektra i plazmidne beta-laktamaze AmpC. U većini analiziranih izolata, rezistencija na beta-laktamske antibiotike ispoljavala se kroz koprodukciju više različitih beta-laktamaza, od čega su beta-laktamaze TEM, SHV i CTX-M bile najzastupljenije. U 90 % izolata koji su proizvodili beta-laktamazu TEM detektiran je gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, dok je varijanta TEM-116 ovog enzima detektirana samo u izolatima koji produciraju karbapenemazu KPC-2. Geni koji kodiraju beta-laktamazu SHV pokazivali su heterogeniju prirodu, te su u analiziranim izolatima detektirane četiri varijante ovog gena: *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub> i *bla*<sub>SHV-12</sub>. ESBL varijante beta-laktamaze SHV (SHV-5 i SHV-11) (146), detektirane su u ukupno četiri izolata i njihova niska prevalencija među izolatima upućuje na zaključak da ove varijante beta-laktamaze SHV nisu odgovorne za širenje rezistencije na cefalosporine proširenog spektra na području Republike Hrvatske među enterobakterijama smanjene osjetljivosti na karbapeneme.

ESBL fenotip, uočen u analiziranih izolata, uglavnom se javljao kao posljedica proizvodnje beta-laktamaze CTX-M-15 koja je detektirana u svim izolatima koji proizvede CTX-M enzim. Proizvodnja beta-laktamaze CTX-M-15 detektirana je u 62 % izolata no nije bila jednako zastupljena među izolatima različitih bakterijskih vrsta. Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> detektiran je u 80 % izolata *K. pneumoniae*, dok je u *E. cloacae* navedeni gen bio detektiran u 30 % izolata. Na razini ukupne populacije izolata, proizvodnja CTX-M-15 bila je zastupljenija u izolata koji ne proizvode karbapenemaze i iznosio je 74 %, dok je među izolatima koji proizvode karbapenemaze gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> detektiran u 37 % izolata. Proizvodnja CTX-M-15 bila je zastupljenija u skupini izolata koji ne proizvode karbapenemaze, neovisno o bakterijskoj vrsti. Velika zastupljenost gena *bla*<sub>CTX-M-15</sub> među izolatima koji ne proizvode karbapenemaze upućuje na to da je beta-laktamaza CTX-M-15 bitan čimbenik koji doprinosi pojavi smanjene osjetljivosti na ertapenem u enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze.

Iako je frekvencija proizvodnje beta-laktamaze CTX-M-15 bila niža u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze, njena koprodukcija zabilježena je u izolatima koji proizvode karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48. Globalno širenje NDM-1, VIM-1 i OXA-48-producirajućih enterobakterija koje koproduciraju CTX-M-15 često se opisuje u velikom broju znanstvenih radova (30, 147, 148). Na području Republike Hrvatske, koprodukcija CTX-M-15 i metalo-beta-laktamaza opisana je u jednom NDM-1 izolatu *K. pneumoniae* u studiji Mazzariol i sur. iz 2012. (33), u NDM-producirajućim izolatima *E. cloacae* prikupljenim za vrijeme bolničke epidemije u OB Pula tijekom 2013. i 2014. godine (149) te u nedavnoj studiji Bedenić i suradnika iz 2016. godine (150). Proizvodnja beta-laktamaze CTX-M-15 u OXA-48-producirajućim izolatima *K. pneumoniae* na području RH opisana je u studiji Jelić i suradnika iz 2017. koja je objavljena u sklopu ovog rada (32). Koprodukcija beta-laktamaza proširenog spektra, poput CTX-M-15, u OXA-48-producirajućim izolatima širi njihov profil rezistencije na cefalosporine proširenog spektra (36). Zbog smanjene efikasnosti hidrolize karbapenema, izolati koji uz OXA-48 ne koproduciraju ESBL enzime često promiču detekciji ukoliko se koriste isključivo klasične metode detekcije *in vitro* (151). Česta je pojava da se OXA-48-producirajući izolati naknadno identificiraju na račun njihovog ESBL fenotipa uzrokovanog koprodukcijom beta-laktamaza proširenog spektra. Iako se proizvodnja beta-laktamaze CTX-M redovito opisuje u KPC-producirajućih enterobakterija u literaturnim navodima iz različitih dijelova svijeta (152-154) uključujući i Republiku Hrvatsku (155), gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> nije detektiran niti u jednom KPC-2 izolatu. KPC-

producirajući izolati *K. pneumoniae* koji ne proizvode beta-laktamazu CTX-M često su opisivani, poglavito u izolatima u državama na području Sredozemlja (156, 157).

Aminoglikozidi su vrlo važni antibiotici baktericidnog djelovanja koji svoju antibakterijsku aktivnost ispoljavaju inhibirajući jedan ili više biokemijskih mehanizama uključenih u proces translacije na bakterijskim ribosomima (158). Stečena rezistencija na aminoglikozide, u analiziranih izolata, ispoljavala se kroz istovremenu proizvodnju nekoliko aminoglikozid-modificirajućih enzima. Zbog lokalizacije na pokretnim genetičkim elementima poput plazmida i transpozona, geni koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime široko su rašireni među Gram-negativnim bakterijama (159). U ukupnoj populaciji analiziranih izolata detektirano je 7 različitih gena koji kodiraju aminoglikozid modificirajuće enzime. Među njima, najzastupljeniji su bili *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aac(3')-II* i *aadA1*. Velika zastupljenost ovih gena među enterobakterijama opisana je u nekoliko studija provedenih u različitim dijelovima svijeta (77, 158, 160, 161).

AAC(6')-Ib je klinički najznačajnija acetil-transferaza koja je primarno odgovorna za razvoj rezistencije na amikacin. Česta je u Gram-negativnih bakterija, posebice u enterobakterija. Prevalencija među izolatima Gram-negativnih bakterija često premašuje 70 % što je u skladu i s rezultatima dobivenim u ovom radu (78). Velika zastupljenost ovog gena među enterobakterijama dovodi se u vezu s lokalizacijom na integronima klase 1 (78). Iako se često povezuje s rezistencijom na amikacin, u ovom je radu zabilježena određena diskrepancija. Samo je 10,8 % izolata bilo rezistentno na amikacin, dok je u isto vrijeme gen *aac(6')-Ib* detektiran u 80 % izolata. Navedena diskrepancija opisana je u znanstvenoj literaturi i niske MIK vrijednosti amikacina često se uočavaju u izolatima koji proizvode AAC(6')-Ib što je vrlo vjerojatno posljedica smanjene ekspresije gena ili smanjene enzimске aktivnosti (77).

Enzim APH(3')-Ia odgovoran je za rezistenciju na kanamicin i neomicin. Široko je rasprostranjen među Gram-negativnim bakterijama zahvaljujući lokalizaciji gena na transpozonomima i širokom spektru različitih plazmida. Iako je primjena kanamicina i neomicina u kliničkoj praksi manje učestala od primjene gentamicina i amikacina, smatra se da je razlog velike prevalencije ovog enzima među Gram-negativnim bakterijama uzrokovan vezanim nasljeđivanjem s ostalim genima rezistencije (77, 162).

AAC(3')-II je enzim koji je primarno odgovoran za rezistenciju na gentamicin, a njegova je prevalencija povezana sa širokom upotrebom ovog antibiotika (78, 160). Iako svi navedeni aminoglikozid-modificirajući enzimi detektirani u ovom radu (osim APH(3')-Ia i AAC(6')-Ib) uglavnom doprinose razvoju rezistencije na gentamicin, najveći doprinos

stvaranju rezistencije na ovaj antibiotik pokazuje enzim AAC(3')-II (163). Rezultati dobiveni analizom izolata u ovom radu navode na sličan zaključak s obzirom da se zastupljenost izolata rezistentnih na gentamicin podudara s brojem izolata u kojih je detektiran gen *aac(3')-II*.

AADA1, poznat kao i ANT (3'), jedan je od najučestalijih aminoglikozid-modificirajućih enzima iz skupine aminoglikozid-O-nukleotidil-transferaza među enterobakterijama (78). Odgovoran je za rezistenciju na spektinomycin i streptomycin. Njegovoj raširenosti među enterobakterijama uvelike doprinosi smještaj gena *aadA1* u genskim kazetama integrona klase 1 i 2 (158, 161, 164, 165). S obzirom na navedeno, ne iznenađuje što je ovaj gen detektiran u velikom broju analiziranih izolata. Povećana zastupljenost gena *aadA1* u skupini izolata koji proizvode karbapenemaze u ovom radu posljedica je njegove prisutnosti u VIM-1 izolatima. Navedeni gen detektiran je u svim VIM-1 izolatima *E. cloacae*, u 81% izolata VIM-1 *K. pneumoniae* te u svim VIM-1 izolatima *C. freundii* i *K. oxytoca*. Velika zastupljenost gena *aadA1* u VIM-1 izolatima enterobakterija često se opisuje jer je gen *aadA1* sastavni dio genskih kazeta integrona klase 1 koji su odgovorni za mobilizaciju i širenje gena *bla<sub>VIM-1</sub>* (72, 139, 166-168).

Geni koji kodiraju ribosomske metilaze nasreću nisu detektirani niti u jednom izolatu. Ovo otkriće u skladu je sa saznanjima navedenim u znanstvenoj literaturi koja ove gene rezistencije uglavnom povezuje sa zemljama istočne i južne Azije (79).

Potrebno je naglasiti da varirajuću prirodu rezistencije na aminoglikozide treba promatrati u kontekstu prisutnih mehanizama rezistencije i generalnih karakteristika pojedinih izolata (76). Kao što je prikazano i u rezultatima ovog rada, valja obratiti pozornost na prisutnost velikog broja aminoglikozid-modificirajućih enzima u višestruko-rezistentnim izolatima koji pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme i terapiju treba prilagoditi ovisno o osjetljivosti pojedinog uzročnika nevezano radi li se o monoterapiji i kombiniranoj terapiji. Kao što je prikazano, geni rezistencije na aminoglikozide često se vezano nasljeđuju s genima rezistencije za ostale klase antibiotika, poglavito genima koji kodiraju karbapenemaze i beta-laktamaze proširenog spektra. *In cis* lokacija gena koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime različitih spektara djelovanja na istom plazmidu ili integronu smanjuje mogućnost rotacije aminoglikozida u kliničkoj praksi neovisno o učestalosti primjene pojedinih aminoglikozida i naporima koji se ulažu u kontrolu potrošnje antibiotika (158).

Visoka stopa rezistencije na sulfametoksazol analiziranih izolata bila je u skladu s prevalencijom gena *sul1* i *sul2*. Gen *sul1* detektiran je u 81,6% izolata dok je *sul2* detektiran u ukupno 36,8% izolata. Gen *sul1* sastavni je dio integrona tipa 1, mobilnih genetičkih elemenata koji nose gene rezistencije na različite klase antibiotika. *Sul1* se često opisuje u

varijantama integronima klase 1 koji u svojoj 3'-konzerviranoj regiji sadrži fuzioniranu strukturu sastavljenu od djelomično deletiranog gena *qacEΔI*, odgovornog za rezistenciju na antiseptike, i gena *sulI*. Spomenuti integroni opisani su u velikom broju literaturnih navoda i identificirani su u izolata enterobakterija koji proizvode beta-laktamazu CTX-M-15, te karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48 (123, 168-170). Gen *sul2* nije povezan s integronima klase 1 što ide u prilog činjenici da je u ovom radu detektiran u manjem broju izolata. Također je opisan u brojnih izolata koji proizvode karbapenemaze, no povezanost s tim genima za rezistenciju posljedica je plazmidne lokacije gena *sul2* koja nije u nikakvoj vezi s integronskim strukturama (148, 171-173).

Od gena za rezistenciju na tetracikline, među analiziranim je izolatima detektirana prisutnost gena *tetD*, *tetA* i *tetB* koji su karakteristični za Gram-negativne bakterije (174). Visoki udio izolata s genom *tetD*, u ovom radu, zabilježen je među izolatima *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze. Gen *tetA* također je u većoj mjeri detektiran u ovoj skupini izolata, no ravnomjernije je distribuiran među izolatima *E. cloacae* neovisno o tome proizvode li karbapenemaze ili ne. Zabilježena veza gena *tetD* i CTX-M-15 izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze do sada nije opisana u znanstvenoj literaturi. U jednoj studiji iz Ujedinjenog Kraljevstva provedenoj na višestruko rezistentnim izolatima *K. pneumoniae* zabilježena je prisutnost gena *tetA* i *tetD* (175).

Iako je do sada opisano 5 varijanti gena *qnr*, u ovom su radu detektirani geni *qnrB*, *qnrA* i *qnrS* koji se inače najčešće dovode u vezu s višestruko rezistentnim enterobakterijama (176-179). Prisutnost gena *qnrB* bila je izraženija u VIM-1 izolatima *E. cloacae*. Ovaj gen se često opisuje u VIM-1 izolatima enterobakterija za što je odgovorna njegova plazmidna priroda i veza s integrona klase 1 (177, 180). Veza gena *qnrB* i *bla<sub>VIM-1</sub>* u izolata *E. cloacae* na području Republike Hrvatske opisana je u studiji Zujčić-Atalić i suradnika (181) i potvrđuje zapažanja ovog rada. Iako se geni *qnrA* i *qnrS*, kao sastavni dio genskih kazeta integrona klase 1, često opisuju u kliničkim izolatima enterobakterija, u ovom radu detektirani su u relativno malom broju izolata (177). Njihova distribucija nije bila povezana s mehanizmom rezistencije na karbapeneme ili bakterijskom vrstom. Distribucija navedenih gena među kliničkim izolatima enterobakterija varira od studije do studije, ovisno o geografskom području, te klonskom i plazmidnom kontekstu analiziranih izolata.

Geni koji kodiraju gene za rezistenciju na kloramfenikol detektirani su u najmanjem broju izolata. Koprodukcija ovih dvaju gena detektirana je u samo jednog izolata *K. pneumoniae* koji proizvodi NDM-1, a njihova prisutnost u enterobakterijama koje proizvode karbapenemaze Amblerove klase B je otprije poznata (173).

S obzirom da je u ovom istraživanju višestruko rezistentan fenotip zabilježen u gotovo svih analiziranih izolata, neovisno o mehanizmu rezistencije na karbapeneme, pri čemu su u 77% izolata detektirani geni za rezistenciju na tri ili više klasa antibiotika, hipoteza H2 „Rezistencija na karbapeneme se udruženo nasljeđuje s rezistencijom na druge grupe antibiotika.“ se prihvaća.

Iako je proizvodnja karbapenemaza najefikasniji mehanizam rezistencije na karbapeneme u enterobakterija, prisutnost ESBL enzima u bakterijskoj stanici, u kombinaciji sa smanjenom propusnošću bakterijske stanice za karbapeneme, također igra bitnu ulogu u ispoljavanju rezistencije. U ovom radu mjerena je razina relativne ekspresije gena *ompK35* i *ompK36* koji kodiraju istoimene porinske kanale u *K. pneumoniae*, gena *ompC* i *ompF* u *E. cloacae*, te *omp35* i *omp36* u *E. aerogenes*. Razina ekspresije porinskih kanala nije mjerena u izolata vrsta *K. oxytoca*, *P. mirabilis* i *C. freundii* zbog male populacije izolata i slabo okarakterizirane genske pozadine ekspresije porinskih kanala.

Rezultati mjerenja relativne ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale i efluks pumpe u izolata *K. pneumoniae*, *E. cloacae* i *E. aerogenes* ukazuju na prisutnost mehanizma rezistencije na karbapeneme (ertapenem) koji se bazira na kombinaciji smanjene propusnosti bakterijske stanice i proizvodnje beta-laktamaze proširenog spektra - CTX-M-15. U izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze, ekspresija gena *ompK35* bila je 40x niža u odnosu na relativnu ekspresiju tog istog gena u kontrolnoj skupini sačinjenoj od osjetljivih izolata. Za razliku od *K. pneumoniae*, uočeno je da na koncentraciju karbapenema u izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze utječu čak dvije transmembranske strukture: *acrAB* i *ompC*. Razina relativne ekspresije gena koji kodiraju efluks pumpu *acrAB* bila je 11x veća, dok je razina ekspresije gena *ompC* bila 12x niža od razine relativne ekspresije navedenih gena u kontrolnoj skupini osjetljivih izolata. Navedeni rezultati upućuju na to da se smanjenje koncentracije antibiotika u bakterijskim stanicama izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze vrlo vjerojatno postiže kombinacijom smanjene propusnosti bakterijske stanice i aktivnog izbacivanja antibiotika efluks pumpom *acrAB*.

U velikom broju studija otkriveno je da gubitak porina *OmpK35* i/ili *OmpK36* u sojeva *K. pneumoniae* ne uzrokuje klinički bitnu pojavu rezistencije ukoliko u pozadini ne postoji dodatni mehanizam rezistencije (38). U ESBL-producirajućih sojeva *K. pneumoniae* česta je pojava da se u potpunosti gubi porinski kanal *OmpK35*, dok sojevi *K. pneumoniae* koji ne proizvode ESBL uglavnom zadržavaju oba porinska kanala (50). *OmpK35*, u odnosu na *OmpK36*, zbog većih dimenzija omogućuje lakšu difuziju molekula antibiotika u stanicu,



pa se gubitak isključivo OmpK35 javlja kao adaptacija na selekcijski pritisak prouzrokovan učestalom primjenom antibiotika (38).

Poznato je da se smanjena osjetljivost na ertapenem, u sojeva *K. pneumoniae* koji ne proizvode OmpK35 i OmpK36, često javlja u kombinaciji s proizvodnjom plazmidnih beta-laktamaza AmpC, ili beta-laktamaza proširenog spektra (38). U prilog tome idu i rezultati ovog rada s obzirom da je u 96,2 % izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze detektiran gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. U isto vrijeme, utjecaj spomenutih mehanizama na antibakterijsku aktivnost imipenema i meropenema ostaje minimalan zbog manjih dimenzija i zwitterionske prirode ovih karbapenema (38). U sojeva *K. pneumoniae* kojima nedostaju oba navedena porinska kanala, rezistencija na imipenem i meropenem javlja se tek u kombinaciji s proizvodnjom karbapenemaza te nekih plazmidnih beta-laktamaza AmpC(38).

Pregledom rezultata mjerenja relativne ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale u izolata *E. cloacae* može se zaključiti da je u analiziranih izolata smanjenje propusnosti posredovano smanjenjem ekspresije gena *ompC*. Porinski kanal OmpC je analog OmpK36 u vrste *K. pneumoniae*, odnosno OmpC u *E. coli* (38). Iako su OmpC i OmpF u vrste *E. cloacae* analozi OmpK36 i OmpK35, njihova uloga i važnost pod selekcijskim pritiskom primjene antibiotika nije toliko detaljno opisana kao kod *K. pneumoniae*. Kao što je već navedeno, i u slučaju vrste *E. cloacae*, smanjenje propusnosti prouzrokovano gubitkom porinskih kanala zahtijeva prisutnost pozadinskih mehanizama rezistencije kako bi se ispoljila rezistencija na karbapeneme (41). Smanjena ekspresija gena *ompC* u odnosu na *ompF* u izolata *E. cloacae* rezistentnih na ertapenem opisana je u nekoliko studija (40, 45). Ovakav mehanizam također utječe samo na antimikrobnu aktivnost ertapenema, dok antimikrobna aktivnost imipenema i meropenema ostaje uglavnom pošteđena (40).

U izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze, gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> detektiran je u 37 % izolata. S obzirom da predstavnici roda *Enterobacter*, za razliku od *K. pneumoniae*, posjeduju kromosomski kodiranu beta-laktamazu AmpC, čija konstitutivna ekspresija često rezultira rezistencijom na cefalosporine proširenog spektra i smanjenjem osjetljivosti na karbapeneme, proizvodnja ESBL enzima nije nužan preduvjet da bi se manifestirao fenotip smanjene osjetljivosti na karbapeneme (49, 178). Konstitutivna ekspresija i pojačana proizvodnja kromosomski kodirane AmpC uglavnom se javlja kao posljedica mutacijskih događaja koji narušavaju kontrolu ekspresije pri čemu se gubi inducibilna priroda ekspresije ovih enzima (178).

Iako je uloga porinskih kanala Omp35 i Omp36 u razvoju rezistencije na karbapeneme u *E. aerogenes* detaljno okarakterizirana u znanstvenoj literaturi, ekspresija gena koji kodiraju

istoimene porinske kanale u analiziranim izolatima i kontrolnim izolatima divljeg tipa nije se značajno razlikovala (38, 40).

Kao i smanjena propusnost bakterijske stanice koja je uzrokovana promjenama u ekspresiji porinskih kanala, efluks pumpe su također uključene u razvoj rezistencije na velik broj različitih klasa antibiotika (43). AcrAB-TolC jedna je od najznačajnijih efluks pumpi iz RND porodice efluks pumpi koja u enterobakterija igra vrlo važnu ulogu u razvoju intrinzičke i stečene rezistencije. Uloga ove pumpe dobro je opisana u izolata *K. pneumoniae*, *E. cloacae* i *E. aerogenes* (44, 45). Povišena razina ekspresije gena *acrB* detektirana je samo u izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze. S obzirom na izolate divljeg tipa iz kontrolne skupine, razina relativne ekspresije u izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze bila je 11 puta viša. U izolata *K. pneumoniae* i *E. aerogenes* razlika u ekspresiji ovog gena nije uočena u odnosu na kontrolne skupine izolata divljeg tipa. Navedeni rezultati u skladu su sa saznanjima dosad objavljenim u znanstvenoj literaturi i upućuju na to da navedena efluks pumpa ne igra ključnu ulogu u razvoju rezistencije na karbapeneme u analiziranih izolata. Iako ova efluks pumpa doprinosi višestrukoj rezistenciji, istraživanja pokazuju da je njen utjecaj na koncentraciju beta-laktamskih antibiotika, poglavito karbapenema, u bakterijskoj stanici marginalan (44, 45). U nekoliko studija koje su se bavile kliničkim izolatima enterobakterija rezistentnih na ertapenem nije uočena pojačana ekspresija ove pumpe (40-42). S obzirom da navedena efluks pumpa iz bakterijske stanice vrlo efikasno uklanja eritromicin, tetracikline, kloramfenikol, aminoglikozide i neke beta-laktamske antibiotike, povišena ekspresija gena *acrB* u izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze vrlo vjerojatno nije isključiva adaptacija na primjenu karbapenema već se javlja zbog njenog doprinosa u općenitom ispoljavanju višestruko rezistentnog fenotipa (44).

U ovom radu, u analizi mehanizama vezanih uz propusnost bakterijske stanice, mjerena je relativna ekspresija gena koji kodiraju porine koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu. Mjerenje ekspresije gena koji kodiraju porinske kanale daje indirektan uvid u pozadinu permeabilnosti bakterijske stanice i ne pruža uvid u funkcionalne značajke porinskih kanala. Na propusnost bakterijske stanice, u kontekstu porina, utječe kombinacija razine ekspresije gena i njihova funkcionalnost. Funkcionalnost gena uglavnom je povezana s mutacijama koji mogu rezultirati sintezom krnjeg proteina ili proteina smanjene funkcionalnosti. Zbog navedenog, uz mjerenje ekspresije gena preporučljivo bi bilo profilirati porinske kanale SDS-PAGE elektroforezom i sekvenciranjem odgovarajućih gena u svrhu detaljnije karakterizacije propusnost bakterijske stanice. U isto vrijeme valja naglasiti da bi se prilikom mjerenja ekspresije gena koji kodiraju efluks pumpe,

u obzir trebao uzeti sinergistički odnos efluks pumpi i porinskih kanala u regulaciji koncentracije antibiotika u stanicama.

Analiza molekularne epidemiologije izolata enterobakterija uključenih u studiju provedena je PFGE i MLST metodama genotipizacije. Velik broj PFGE grupa i klonskih tipova u koje su svrstani analizirani izolati upućuje na zaključak da je širenje rezistencije na karbapeneme u enterobakterija, na području Republike Hrvatske, tijekom 2011. i 2012. godine, bilo poliklonske prirode. Unatoč poliklonskom sastavu analizirane kolekcije bakterijskih izolata vidljivo je da je za širenje rezistencije na karbapeneme na području RH odgovorna proliferacija određenih klonova *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Iako se u znanstvenoj literaturi epidemijama enterobakterija koje proizvode karbapenemaze nerijetko pripisuje izrazito monoklonski karakter, na temelju rezultata ovog rada nije moguće donijeti generalizirani zaključak.

Proizvodnja karbapenemaza u izolata *K. pneumoniae* identificirana je u ukupno 7 klonskih tipova; ST15, ST16, ST37, ST248, ST258, ST528 i ST418. Svi izolati *K. pneumoniae* koji proizvode KPC-2 pripadali su visoko rizičnom klonskom tipu ST258 i pokazivali su nisku genetičku varijabilnost unutar PFGE grupe. Monoklonsko širenje bilo je odgovorno za širenje KPC-2-producirajuće *K. pneumoniae* na području središnje i sjeverne Hrvatske s naglaskom na bolničku epidemiju u OB Zabok tijekom 2012. godine. Prisutnost gena *bla<sub>KPC</sub>* do sada je opisana u više od 100 klonskih tipova *K. pneumoniae*, no klonski tip ST258 prepoznat je kao glavni pokretač globalnog širenja KPC-producirajuće *K. pneumoniae* i predstavlja ogledni primjer visoko rizičnog bakterijskog klona (26).

Izolate *K. pneumoniae* koji su proizvodili karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48 karakterizirala je poliklonska genska pozadina neovisno o tome jesu li se promatrali rezultati PFGE ili MLST analize. Proizvodnja karbapenemaza klase B i klase D uglavnom je zabilježena u izolata *K. pneumoniae* klonskih tipova ST15 i ST16. Ova dva klonska tipa predstavljala su glavni rezervoar izolata koji proizvode karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48 u periodu izvođenja ovog istraživanja.

ST15 globalno je rašireni klonski tip *K. pneumoniae* koji je prvenstveno odgovoran za širenje višestruke rezistencije kroz diseminaciju beta-laktamaze CTX-M-15 (182). Otkako je prvi puta opisan u Mađarskoj 2003. godine, ovaj klonski tip *K. pneumoniae* prepoznat je kao jedan od dominantnih ESBL klonova u Europi i nekoliko azijskih zemalja, a navedena povezanost s CTX-M-15 uočena je i u ovom radu (118, 182-185). Većina analiziranih izolata *K. pneumoniae* koji su proizvodili metalo-beta-laktamaze pripadala je klonskom tipu ST15. Ukupno je 66 % VIM-1 izolata i 2 od ukupno 3 NDM-1 izolata *K. pneumoniae* bilo ovog

klonskog tipa. Navedeni rezultati u skladu su sa znanstvenom literaturom jer se ST15 klon *K. pneumoniae* koji proizvodi NDM-1 često dovodi u vezu s područjem Balkana (137, 186). Proizvodnja karbapenemaze NDM-1 u izolatima ovog klonskog tipa opisana je i u studiji Kocsis i suradnika iz 2016. koja je provedena na izolatima enterobakterija prikupljenim u periodu od 2009. – 2011. na području Republike Hrvatske (187).

Proizvodnja karbapenemaze VIM-1 u izolatima *K. pneumoniae* klonskog tipa ST15 opisana je uglavnom na području Europe, poglavito u Španjolskoj, Portugalu i Mađarskoj (182, 188, 189). Proizvodnja karbapenemaze VIM-1 u klonskom tipu ST15 na području Republike Hrvatske opisana je u studiji Bedenić i suradnika iz 2016 (150). Svi VIM-1-producirajući izolati ovog klonskog tipa svrstani su u istu PFGE grupu što upućuje na zaključak da je širenje ovog klona, na širem geografskom području Republike Hrvatske, epidemiološki povezano. Iako je u ovom radu ST15 prepoznat kao dominantni klon *K. pneumoniae* koja proizvodi karbapenemaze Amblerove klase B, dva izolata ovog klona, prikupljena iz KB Sveti Duh, proizvodila su karbapenemazu Amblerove klase D - OXA-48. Valja naglasiti da kod OXA-48-producirajućih izolata *K. pneumoniae* ovog klonskog tipa PFGE analizom nije uočena nikakva klonska poveznica s VIM-1-producirajućim predstavnicima te ih karakterizira zasebni epidemiološki kontekst. U studiji Oteo i suradnika iz 2015. godine utvrđeno je da je širenje karbapenemaze OXA-48 u Španjolskoj velikim djelom povezano sa širenjem klonskog tipa ST15 (190). Uz ST15, proizvodnja VIM-1 u ovom radu detektirana je u jednom izolatu koji pripada klonskom tipu ST248. Uz općenito rijetku pojavnost ovog klona, proizvodnja karbapenemaze VIM-1 u ST248 do sada nije opisana u literaturi, a izolati ovog klonskog tipa opisani su u SAD-u (191).

Kao i ST15, ST16 je globalno rašireni klonski tip *K. pneumoniae* koji je odgovoran za širenje višestruke rezistencije. Za razliku od ST15, klonski tip ST16 *K. pneumoniae* u ovom je radu prepoznat kao dominantni klon odgovoran za širenje *K. pneumoniae* koje proizvode karbapenemazu OXA-48. OXA-48 izolati ovog klonskog tipa prikupljeni su na području Zagreba i Varaždina. Uz to što su izolati *K. pneumoniae* klonskog tipa ST16 obuhvaćali većinu OXA-48-producirajućih izolata, svi su PFGE analizom svrstani u istu grupu što upućuje na zaključak da su OXA-48-producirajući izolati prikupljeni u Klinici za infektivne bolesti, OB Dubrava, KB Merkur i ZZJZ Varaždinske županije epidemiološki povezani. Karbapenemaza OXA-48 u *K. pneumoniae* klonskog tipa ST16 do sada je opisana samo u Španjolskoj (148). U samo jednog izolata ovog klona, izoliranog u Klinici za infektivne bolesti, detektirana je proizvodnja karbapenemaze NDM-1. Proizvodnja NDM-1 u izolata *K. pneumoniae* ovog klonskog tipa, na području Republike Hrvatske, opisana je u studiji Kocsis i

suradnika iz 2016 (187). Proizvodnja karbapenemaze NDM-1 opisana je i u ST16 izolata *K. pneumoniae* izoliranog u Kanadi iz pacijenta koji je prethodno putovao u Indiju, te u Nizozemskoj (192, 193).

Uz navedene klonske tipove *K. pneumoniae*, proizvodnja karbapenemaze OXA-48 detektirana je u po jednom izolatu klonskih tipova ST37, ST528 i ST1418. ST37 je također jedan od globalno raširenih klonskih tipova, a višestruko rezistentan fenotip ST37 izolata opisan je uglavnom u Europi, Kini i Indiji, dok su OXA-48 izolati ovog klonskog tipa opisani u Francuskoj i Tajlandu (194-197). Izolat klonskog tipa ST37 povezan je s prvim slučajem KPC-producirajuće *K. pneumoniae* u Republici Hrvatskoj, a proizvodnja OXA-48 opisana je u studiji Bedenić i suradnika iz 2016. godine (27, 150). Prema trenutnim saznanjima, proizvodnja OXA-48 u *K. pneumoniae* klonskih tipova ST528 i ST1418 još nije opisana u znanstvenoj literaturi.

Kao i u slučaju *K. pneumoniae*, širenje VIM-1-producirajućih *E. cloacae* u Republici Hrvatskoj karakterizirao je poliklonski karakter s naglaskom na širenje 3 dominantna klonska tipa: ST92, ST105 i ST200. Ovi klonski tipovi u znanstvenoj literaturi nisu prepoznati kao široko rasprostranjeni klonski tipovi *E. cloacae*, štoviše proizvodnja karbapenemaze VIM-1 u ovim klonskim tipovima vezana je samo za područje Republike Hrvatske. KBC Split prepoznat je kao žarište klonskog tipa ST92, KB Dubrava kao žarište klonskog tipa ST200, a centralnu Hrvatsku karakterizirala je pojavnost klonskog tipa ST105.

S 20 prikupljenih izolata, klonski tip ST92 obuhvaćao je 53 % analiziranih VIM-1 izolata *E. cloacae*. Klonski tip ST92 je singlet, ne spada niti u jedan klonski kompleks i njegova povezanost s karbapenemazom VIM-1 opisana je samo u Hrvatskoj (150). S obzirom da je tri četvrtine izolata *E. cloacae* klonskog tipa ST92 u ovom radu prikupljeno u KBC Split i da su VIM-1-producirajući izolati ST92 iz iste ustanove također opisani u studiji Bedenić i suradnika iz 2016. godine može se zaključiti da je prisutnost ovog klonskog tipa u KBC Split poprimila endemski karakter (150). Navedeni klonski tip nije prepoznat u literaturi kao jedan od globalno raširenih klonova značajne epidemiološke važnosti. Uz KBC Split, VIM-1 izolati *E. cloacae* ST92 izolirani su Zagrebu i Šibeniku. Sve navedene izolate, neovisno o geografskom području, karakterizira gotovo identičan PFGE restrikcijski profil što upućuje na visok stupanj klonalnosti navedenih izolata i njihovu epidemiološku povezanost.

Prema zastupljenosti slijede VIM-1 izolati *E. cloacae* koji spadaju u klonski kompleks CC200. U ovaj kompleks spadaju klonski tipovi ST200 i ST105 koji sa 9, odnosno 8 izolata obuhvaćaju 45% VIM-1 izolata *E. cloacae* analiziranih u ovom radu. Klonski tip ST200 je ujedno centralni klonski tip klonskog kompleksa CC200. Svi izolati klonskog tipa ST200

izolirani su u KB Dubrava, a prema PFGE analizi svrstani su u istu grupu restrikcijskih profila što upućuje na klonsko širenje koje je bilo ograničeno samo na ovu ustanovu. Izolati *E. cloacae* klonskog tipa ST200 opisani su u VIM-31 izolata u Turskoj te u CTX-M-15 izolata u Francuskoj (168, 198). Niti jedan izolat ovog klonskog tipa, u ovom radu, nije proizvodio beta-laktamazu CTX-M-15. Izolati klonskog tipa ST105, za razliku od ST200, prikupljeni su sa šireg geografskog područja koje obuhvaća Zagreb, Bjelovar i Gospić, karakterizira ih visok stupanj klonalnosti određen PFGE analizom što upućuje na njihovu epidemiološku povezanost. Prisutnost VIM-1 izolata *E. cloacae* ovog klonskog tipa također je opisana u studiji Bedenić i suradnika iz 2016. godine u kojoj je pojavnost ovog klonskog tipa isključivo bila vezana za područje Zagreba (150). U globalnoj studiji Matsamure i suradnika iz 2017. godine provedenoj na kolekciji VIM izolata *E. cloacae* utvrđeno je da je klonski tip ST105 *E. cloacae* koji proizvodi VIM-1 specifičan samo za područje Republike Hrvatske (168).

Samo je jedan VIM-1 izolat *E. cloacae* pripadao klonskom tipu ST100. Izoliran je u KB Dubrava i predstavljao je izolirani slučaj. Pregledom znanstvene literature nije pronađen niti jedan rad u kojem je opisana proizvodnja karbapenemaze VIM-1 u *E. cloacae* klonskog tipa ST100.

Klonsko širenje nije uočeno samo u sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* koji proizvode karbapenemaze, već je ono uočeno i u sojeva *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze. S druge strane, distribucija izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze po velikom broju PFGE grupa i klonskih tipova upućuje na sasvim suprotan zaključak. Genetičku varijabilnost izolata koji ne proizvode karbapenemaze također je potrebno razmatrati na razini bakterijske vrste i nije ju moguće generalizirati na razini porodice *Enterobacteriaceae*.

Izolate *K. pneumoniae* koji nisu proizvodili karbapenemaze karakterizirala je poliklonska slika sačinjena od 9 klonskih tipova; ST11, ST13, ST14, ST15, ST16, ST29, ST101, ST437 i ST528. Od navedenih klonskih tipova, ST437 obuhvaćao je čak je 88,7 % izolata *K. pneumoniae* koji nisu proizvodili karbapenemaze. Preostali klonski tipovi obuhvaćali su pojedinačne izolate. Veliku prevalenciju izolata ovog klonskog tipa pratila je i velika geografska raširenost. Izolati klonskog tipa ST437 prikupljeni su iz 16 zdravstvenih ustanova raspoređenih u 10 gradova iz svih regija Republike Hrvatske. Iako do sada ovaj klonski tip *K. pneumoniae* nije opisan na području Republike Hrvatske i susjednih zemlja, rezultati ovog rada ukazuju na endemski karakter prisutnosti klonskog tipa ST437 na području RH. U ovom radu utvrđeno je da je ovaj klon prvenstveno odgovoran za širenje CTX-M-15 diljem države pri čemu se rezistencija na ertapenem javlja kao posljedica kombinirane

proizvodnje CTX-M-15 i gubitka porinskih kanala OmpK35. Pregledom znanstvene literature nije utvrđeno da je ovako široka rasprostranjenost ovog klonskog tipa opisana igdje drugdje u svijetu. Klonski tip ST437 opisan je u Brazilu, u KPC-2 izolata *K. pneumoniae* izoliranih na području Rio de Janeira, te u NDM-7 i OXA-245 izolata na području Španjolske (199, 200). ST437 prepoznat je u znanstvenoj literaturi kao kritični klon *K. pneumoniae* koji je, kao član klonske grupe CG11, vrlo blizak srodnik klonskog tipa ST258 (94). Ova saznanja idu u prilog epidemiološkim rezultatima dobivenim u ovom radu i donekle objašnjavaju pozadinu ovako uspješnog širenja ST437 među zdravstvenim ustanovama u Republici Hrvatskoj. Kao član klonske grupe CG11, ST437 se od ST11, centralnog klonskog tipa razlikuje u samo jednom od 7 lokusa koji se analiziraju MLST genotipizacijom. Literaturna zapažanja u skladu su s rezultatima ovog rada, pošto je jedini detektirani izolat ST11 prikazivao vrlo sličan makrorestrikcijski PFGE profil kao i izolati klonskog tipa ST437. Iako ST11 slovi kao klonski tip od velike epidemiološke značajnosti, takav značaj nije uočen u ovom radu s obzirom da je samo jedan izolat *K. pneumoniae* pripadao ovom klonskom tipu (201). Od preostalih klonskih tipova *K. pneumoniae* identificiranih među izolatima koji ne proizvode karbapenemaze valja spomenuti ST13, ST14 i ST101. ST101 široko je rasprostranjeni klonski tip čija je prisutnost opisana u Tunisu, Francuskoj, Španjolskoj, Italiji, Mađarskoj, te zemljama istočne Europe i Azije (202-204). ST13 opisan je u Francuskoj i Španjolskoj, dok je ST14 široko rasprostranjeni klonski tip koji se uglavnom opisuje u kontekstu širenja karbapenemaze NDM-1 u Indiji i Europskim zemljama, no u ovom radu ta veza nije uočena (196, 202, 205).

Klonski tip ST14 *K. pneumoniae* koji proizvodi NDM-1 široko je rasprostranjeni „indijski“ klonski tip čija se ograničena pojavnost u Europi dovodi u vezu s putovanjima na Indijski potkontinent (196). Regija Balkana sekundarni je rezervoar NDM-1-producirajućih enterobakterija koji se vrlo vjerojatno formirao kao posljedica medicinskog turizma prakticiranog u nekim zemljama Balkana koji je uključivao komercijalnu transplantaciju bubrega u pakistanskim bolnicama (206). Ova praksa zabilježena je u zemljama poput Albanije, Makedonije i Kosova (207). Enterobakterije koje proizvode NDM-1 iz ove regije karakterizira drugačija genska pozadina. Valja naglasiti da u sklopu ovog rada nije detektirana proizvodnja karbapenemaze NDM-1 u klonskom tipu ST147, niti u ST11 koji je prepoznat kao rizičan klonski tip koji proizvodi NDM-1 u Grčkoj (137).

Izolate *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze karakterizirala je izrazita poliklonalnost, pri čemu valja izdvojiti ograničeno klonsko širenje izolata klonskog tipa ST114. U usporedbi s izolatima *K. pneumoniae* iz iste skupine, klonsko širenje *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze bilo je puno manjeg dosega.

Izolati *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze razvrstani su u 11 klonskih tipova od kojih su ST114, ST66 i ST78 prepoznati kao globalno rašireni klonski tipovi velikog epidemiološkog potencijala širenja (93). Kao što se često navodi u znanstvenoj literaturi, i u ovom radu, izolati *E. cloacae* klonskog tipa ST114 bili su najzastupljeniji među izolatima *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze (44 %). Većina izolata ovog klonskog tipa prikupljena je na području Zagreba dok su pojedinačni izolati prikupljeni s područja Splita i Čakovca. Makrorestrikcijski profili izolata ovog klonskog tipa dobiveni PFGE analizom prikazivali su određenu genetičku varijabilnost, no i dalje su zadovoljavali kriterij klonalnosti. Većina izolata ovog klonskog tipa izolirana je u KB „Sveti duh“ što upućuje na ograničeno širenje ST114 unutar ove ustanove. Izolati *E. cloacae* koji spadaju u klonski tip ST114 opisanu su u Italiji, Španjolskoj, Grčkoj, Izraelu i Maroku i često se dovode u vezu s proizvodnjom CTX-M-15, iako u ovom radu ta veza nije uočena (93, 198). Iako je proizvodnja karbapenemaze VIM-1 opisana u izolata klonskog tipa ST114 u SAD-u, Grčkoj i Italiji, u ovom radu proizvodnja ove karbapenemaze nije detektirana (168). Klonski tip ST114 čini centralni klonski tip klonskog kompleksa CC114 u koji spada i klonski tip ST66. Izolati klonskog tipa ST66 također su identificirani u ovom radu i prikupljeni su na području Zagreba, Bjelovara i Koprivnice. Makrorestrikcijski profili dobiveni PFGE analizom upućuju na klonsku povezanost svih 5 analiziranih izolata, no u slučaju ovog klonskog tipa široka geografska rasprostranjenost nije posljedica klonskog širenja već se vrlo vjerojatno radi o pojedinačnim slučajevima. Prisutnost klonskog tipa ST66 opisana je u Francuskoj i Izraelu, u izolata *E. cloacae* koji proizvode CTX-M-15, dok je prisutnost gena *bla<sub>VIM-1</sub>* u izolata ovog klonskog tipa detektirana u Tajvanu (93, 168). Od preostalih epidemiološki značajnih klonskih tipova identificiran je samo jedan izolat klonskog tipa ST78 u Bjelovaru. Iako je raširenost ovog klonskog tipa opisana u Francuskoj, Latviji, Izraelu, SAD-u, a izolati koji proizvode VIM-1 identificirani su u Grčkoj, Španjolskoj i Italiji, na području Republike Hrvatske, u ovom radu, ST78 nije pokazao izraženi epidemiološki značaj (93, 168).

Od ostalih klonskih tipova među izolatima *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze, detektirani su izolati klonskog tipa ST90. Izolati ovog klonskog tipa prikupljeni su uglavnom na području Zagreba, te kao pojedinačni slučajevi nisu pokazivali epidemiološke poveznice niti su ih prema PFGE analizi karakterizirale zajedničke klonske karakteristike. Izolati ovog klonskog tipa opisani su u Francuskoj i Grčkoj (93, 168). Iako izolati klonskog tipa ST133 iz Zagreba i Varaždina nisu proizvodili karbapenemaze, u studiji Petrosillo i suradnika iz 2016. ustanovljeno je da je ovaj klonski tip bio odgovoran za izazivanje bolničke epidemije *E. cloacae* koji proizvodi NDM-1 u OB Pula tijekom 2013. i



2014. godine (149). Dva izolata ST171 prikupljeno je u KB Dubrava, ovaj klonski tip opisan je u Francuskoj, SAD-u i Rumunjskoj (93, 208, 209). Klonski tipovi ST51, ST104, ST122, ST542 i ST550 identificirani su u pojedinačnih izolata od čega su samo ST104 i ST122 opisani u literaturi na području Francuske, Grčke i Španjolske dok za ostale literaturni navodi nisu pronađeni (93).

Na temelju rezultata vidljivo je da se ne može donijeti jednostavni zaključak kojim bi se opisala kompleksna priroda širenja enterobakterija rezistentnih na karbapeneme na području RH za vrijeme provođenja ovog istraživanja. Genetička raznolikost izolata koji proizvode karbapenemaze ovisi o bakterijskoj vrsti i karbapenemazi koja je predmet istraživanja. Iako je širenje KPC-2-producirajuće *K. pneumoniae* bilo monoklonskog karaktera, proizvodnju ostalih karbapenemaza karakterizirao je poliklonski genetički kontekst. Uočena je sprega između određenih karbapenemaza i većeg broja višestruko rezistentnih klonova *K. pneumoniae* i *E. cloacae* koji zbog povećanog epidemijskog potencijala služe kao glavna pokretačka sila vertikalnog širenja gena koji kodiraju karbapenemaze. Proizvodnja karbapenemaza detektirana je i u pojedinačnim izolatima koji nisu imali nikakve epidemiološke poveznice niti su bili uključeni u klonsko širenje. S obzirom na navedeno, ne može se reći da su sojevi koji proizvode karbapenemaze monoklonskog porijekla, pa se zbog toga hipoteza H3 „Sojevi koji proizvode karbapenemaze su monoklonskog porijekla“ odbacuje. Pri tome treba naglasiti da je monoklonsko širenje uočeno kod KPC-2-producirajuće *K. pneumoniae* iznimka koja se u okviru ovog rada ne može gledati zasebno.

Izrazito niska genetička varijabilnost izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze ukazuje na uznapredovalo klonsko širenje i kosi se s dosadašnjim literaturnim zapažanjima i teoretskim postavkama. Prema literaturi, pojava enterobakterija rezistentnih na karbapeneme koje rezistenciju ne ispoljavaju proizvodnjom karbapenemaza uglavnom je nasumična, a zbog nestabilnosti takvih mehanizama rezistencije i njihovog negativnog utjecaja na kompetitivnost bakterijske stanice, širenje često ima ograničeni doseg (4). Kao što je već spomenuto, rezistencija na karbapeneme koja nije posredovana proizvodnjom karbapenemaza javlja se kao sinergija smanjene koncentracije karbapenema u bakterijskoj stanici i proizvodnje beta-laktamaza poput CTX-M i AmpC. Generalno mišljenje je da je pojavnost ovakvog vida rezistencije na karbapeneme epidemiološki manje značajna i da se javlja kao posljedica spontanih mutacija koje rezultiraju gubitkom funkcionalnih porinskih kanala, što bi trebalo rezultirati sporadičnom pojavom ovakvih izolata. Gubitak porinskih kanala ima negativan utjecaj na kompetitivnost bakterija s obzirom da su ove strukture direktno vezane uz unos nutrijenata u bakterijsku stanicu i izlučivanje produkata metabolizma

(4, 8). U ovom radu utvrđeno je da širenje *K. pneumoniae* nije posljedica nasumične pojave rezistentnih mutanti nastalih u uvjetima selektivnog pritiska zbog primjene karbapenema, već je posljedica dominantnog širenja klon ST437. U literaturi se javlja sve više radova s opisima mehanizama kojima bakterije kompenziraju negativan utjecaj spomenutih mutacija na kompetitivnost bakterijske stanice i potencijal širenja, štoviše otkriveno je da ovakvi mutanti u svega 250 generacija uspijevaju rekonstituirati kompetitivni fenotip (210-213). Potrebno je naglasiti da je u velikom broju studija ovakav mehanizam detektiran odmah pri prvoj izolaciji, te da se vrlo rijetko javlja kao adaptacija na selektivni pritisak nastao primjenom antibiotika tijekom liječenja pojedinog pacijenata (105).

Genetička varijabilnost izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze ukazuje na to da je, za razliku od *K. pneumoniae*, klonsko širenje ograničeno, no prisutno. Valja naglasiti da je prisutnost rizičnih klonova ST114, ST66, i ST78 zabilježena u ovoj skupini izolata *E. cloacae* što ukazuje na mogućnost eventualnog klonskog širenja koje je vidljivo kod ST437 *K. pneumoniae*.

Širenje rezistencije na karbapeneme u enterobakterija nije isključivo vertikalnog karaktera, već je ujedno i posljedica horizontalnog prijenosa gena rezistencije na antibiotike koje se javlja među bakterijama istih ili različitih vrsta. Horizontalni prijenos gena koji kodiraju karbapenemaze uglavnom se odvija prijenosom plazmida, izvankromosomskih molekula DNA koje se autonomno repliciraju unutar bakterijske stanice i značajan su čimbenik koji utječe na formiranje bakterijskog rezistoma (95).

U ovom radu karakterizacija plazmida provedena je samo u izolata koji su proizvodili karbapenemaze i u odgovarajućih transkonjugata *E. coli* A15 R u kojih je dokazan uspješan horizontalni prijenos gena za rezistenciju na karbapeneme. Zbog ograničenja aparature, dimenzija gela i karakteristika S1-PFGE metode nisu se mogli detektirati DNA fragmenti manji od ~40 kb, pa postoji vjerojatnost da ovom metodom nisu detektirani neki manji plazmidi. Analizirani izolati prikazivali su varijabilan plazmidni profil i po broju i po veličini plazmida. Varijabilnost u profilu plazmida uočena je u izolata istih klonskih kategorija određenih PFGE i MLST analizom. Varijabilnost plazmidnog profila često se opisuje i posljedica je njihovog horizontalnog prijenosa i čestih genskih preslagivanja koji nerijetko rezultiraju promjenom njihove veličine (25).

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se konstatirati da se geni koji kodiraju karbapenemaze nalaze na plazmidima. U 95% izolata, koji su rezistenciju na karbapeneme ispoljavali proizvodnjom karbapenemaza, uspješno je određen njihov plazmidni smještaj. Iako u preostalih 5% izolata nije bilo moguće utvrditi plazmidni smještaj gena, zbog

ograničenja S1-PFGE metode koja su ranije navedena, ne može se sa sigurnošću isključiti njihova plazmidna priroda. Geni koji kodiraju karbapenemaze nalazili su se samo na jednom plazmidu iako je plazmidni profil većine analiziranih izolata bio sačinjen od jednog do šest plazmida.

Općenito gledajući, pregledom rezultata vidljivo je da se geni koji kodiraju karbapenemaze nalaze na vrlo heterogenoj skupini plazmida neovisno o tome gledaju li se iz aspekta veličine ili skupine inkompatibilnosti. Velika varijabilnost utvrđena je među plazmidima na kojima su bili smješteni geni koji kodiraju karbapenemaze KPC-2, VIM-1 i NDM-1 dok su geni *bla*<sub>OXA-48</sub> redom detektirani na identičnim plazmidima veličine ~60 kb IncL/M skupine inkompatibilnosti. Geni *bla*<sub>KPC-2</sub> u gotovo svih analiziranih KPC-2-producirajućih izolata detektirani su na plazmidu IncFII. Usprkos tome, ove je plazmide karakterizirala varijabilna veličina koja se kretala u rasponu od ~160 - ~210 kb. Varijacija u veličini je vrlo vjerojatno posljedica čestih preslagivanja plazmidne DNA uzrokovane, u velikom broju slučajeva, pokretnim genetičkim elementima (25).

Do sada su u literaturi opisani plazmidi nekoliko različitih skupina inkompatibilnosti koji su detektirani u KPC-producirajućih izolata *K. pneumoniae* klonskog tipa ST258. Među njima se najviše ističu IncF (FII i FIA), IncI2, IncX, IncA/C, IncR i ColE, koji uz *bla*<sub>KPC</sub>, nose i gene za rezistenciju na ostale klase antibiotika (25). Među navedenima, plazmidi iz skupine IncFII zasigurno su najdominantniji izvankromosomski elementi koji se dovode u vezu s ovom karbapenemazom jer, vrlo vjerojatno, uz *bla*<sub>KPC</sub> nose i gene koji pozitivno doprinose epidemiološkom potencijalu širenja klona ST258 (25, 106). IncF plazmidi čine kompleksnu i raznoliku skupinu plazmida koji su ograničeni na uzak krug bakterijskih vrsta (25).

Varijabilna veličina plazmida na kojima su smješteni geni *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>NDM-1</sub> (~50 - ~340 kb) posljedica je uočene povezanosti ovih karbapenemaza s velikim brojem plazmida iz različitih skupina inkompatibilnosti. Gen *bla*<sub>VIM-1</sub> detektiran je na plazmidima koji spadaju u IncL/M i IncN skupinu inkompatibilnosti dok je *bla*<sub>NDM-1</sub> detektiran na plazmidima IncA/C, IncL/M i IncR. Valja naglasiti da plazmidi veličine ~180 i ~200 kb koji su detektirani u 75% analiziranih VIM-1-producirajućih izolata *E. cloacae* nisu mogli biti tipizirani PBRT metodom. Iako su regije plazmida zadužene za replikaciju evolucijski očuvane, važno je naglasiti da se PBRT metodom tipizacije plazmida ne mogu klasificirati svi plazmidi zbog polimorfizama koji se znaju javljati u ovim regijama ili pak nisu uključeni u shemu tipizacije koja je opisana u studiji Carattoli i suradnika (25, 101). Kako bi se detaljnije analizirali spomenuti plazmidi potrebno je sekvencirati cijele plazmide što je izvan dosega ovog rada.

Veza gena *bla*<sub>VIM-1</sub> i plazmida IncN i IncL/M skupine inkompatibilnosti davno je opisana u literaturi, a rezultati ovog rada potvrđuju i nadopunjuju ranije opise. Plazmidi skupine inkompatibilnosti IncN su plazmidi velikog potencijala širenja i pronađeni su širokom spektru vrsta enterobakterija (139). Plazmid IncN, veličine ~50 kb, koji nosi gen *bla*<sub>VIM-1</sub> opisan je u velikom broju VIM-1 izolata enterobakterija u Italiji (56). Plazmid istih karakteristika prepoznat je kao epidemijski plazmid koji je odgovoran za širenje gena *bla*<sub>VIM-1</sub> u Grčkoj (56). Iako je uglavnom uočen u izolata *K. pneumoniae*, odgovoran je za širenje gena *bla*<sub>VIM-1</sub> u druge bakterijske vrste, poput *E. cloacae* i *E. coli* (140, 142, 214, 215). Povezanost gena *bla*<sub>VIM-1</sub> i plazmida IncN opisana je i u VIM-1 izolata *K. pneumoniae* i *E. cloacae* u Hrvatskoj, u sklopu studije Bedenić i suradnika iz 2016. godine (150). Rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na zaključak da je prisutnost navedenog epidemijskog plazmida uočena i u izolata prikupljenih na području Republike Hrvatske, u periodu koji obuhvaća 2011. i 2012. godinu, no za razliku od Grčke, uloga širenja ovog plazmida u diseminaciji gena *bla*<sub>VIM-1</sub> nije bila značajna.

Povezanost gena *bla*<sub>VIM-1</sub> i plazmida IncL/M opisana je u izolata enterobakterija rezistentnih na karbapeneme na području republike Hrvatske u studiji Bedenić i suradnika iz 2016. godine (150). Plazmidi IncL/M skupine inkompatibilnosti su konjugabilni, karakterizira ih velik potencijal širenja među različitim vrstama enterobakterija i prepoznati su kao jedni od najvažnijih plazmida odgovornih za širenje rezistencije na antibiotike među klinički značajnim bakterijskim vrstama iz porodice *Enterobacteriaceae* (95). Plazmidi IncL/M skupine inkompatibilnosti su endemski plazmidi regije Mediterana, no s vremenom su se proširili u ostala područja svijeta i njihova prisutnost je poprimila globalan karakter (106). Često istovremeno nose gene za rezistenciju na različite klase antibiotika, uključujući i gene koji kodiraju karbapenemaze KPC, VIM, NDM i OXA-48 (95).

Rezultati tipizacije plazmida koji nose gen *bla*<sub>NDM-1</sub> u skladu su s dosadašnjim literaturnim zapažanjima s obzirom da su sva tri detektirana tipa plazmida opisana u NDM-1-producirajućih enterobakterija (64). Povezanost gena *bla*<sub>NDM-1</sub> s plazmidima IncA/C skupine inkompatibilnosti opisana je u Indiji kao primarnom rezervoaru NDM-1-producirajućih enterobakterija i zemljama u kojima su zabilježeni slučajevi u pacijenata koji su prethodno putovali na Indijski potkontinent (147). Prisutnost plazmida sve tri skupine inkompatibilnosti u NDM-1 izolata enterobakterija opisana je i na području Republike Hrvatske. U sklopu studije Bedenić i suradnika iz 2016. uočena je povezanost gena *bla*<sub>NDM-1</sub> i plazmida IncL/M i IncA/C skupina inkompatibilnosti (150). Studija Kocsis i suradnika iz 2016. godine provedena na izolatima *K. pneumoniae* i *C. koseri*, prikupljenih u periodu od 2009. – 2011.

godine opisuje gen *bla*<sub>N<sub>DM-1</sub></sub> u kontekstu IncR i IncA/C plazmida (187). Iako plazmidi IncR skupine inkompatibilnosti slove kao nekonjugabilni, u ovom radu horizontalni transfer je uspješno izvršen. Smatra se da ovi plazmidi ipak imaju veliku važnost u horizontalnom širenju gena za rezistenciju jer su i u njih opisana različita preslagivanja DNA molekule i rekombinacijski događaji koji su utjecali na njihov potencijal horizontalnog prijenosa (103).

Gen *bla*<sub>OXA-48</sub> u svim je OXA-48-producirajućim izolatima analiziranim u ovom radu detektiran na plazmidima veličine ~60 kb iz IncL/M skupine inkompatibilnosti. Ovaj plazmid odgovoran je za globalno širenje gena *bla*<sub>OXA-48</sub> i redovito se opisuje u znanstvenim radovima koji se bave epidemiologijom i širenjem enterobakterija koje proizvode karbapenemazu OXA-48 (30, 31, 148, 151, 216). Za razliku od ostalih karbapenemaza, glavnu pokretačku silu ne čine epidemijski klonovi već se širenje oslanja na „difuziju“ ovog epidemijskog plazmida među enterobakterijama. Veliki potencijal širenja dotičnog plazmida zabilježen je i u ovom radu. Horizontalni prijenos gena *bla*<sub>OXA-48</sub> konjugacijom bio je iznimno uspješan i svi analizirani OXA-48 izolati *K. pneumoniae* prenijeli su gen *bla*<sub>OXA-48</sub> u *E. coli* A15R. Za razliku od ostalih IncL/M plazmida, transpozon *Tn1999* koji sadrži *bla*<sub>OXA-48</sub>, ugrađen je u gen *tir* koji kodira protein odgovoran za inhibiciju horizontalnog prijenosa plazmida. Zbog ovakve insercije, gen *tir* postao je nefunkcionalan što je rezultiralo povećanjem frekvencije horizontalnog prijenosa gena (217). U usporedbi s ostalim plazmidima IncL/M skupine inkompatibilnosti, plazmid *bla*<sub>OXA-48</sub> IncL/M karakterizira 40 puta veća efikasnost horizontalnog prijenosa (106). Prvi slučaj OXA-48 producirajuće *K. pneumoniae* i početna faza širenja u Republici Hrvatskoj otkriveni su u sklopu ovog rada sredinom 2012 (32). U daljnjih 6 mjeseci koje obuhvaća ovo istraživanje prikupljeno je ukupno 12 izolata koje karakterizira poliklonska genska pozadina kojom dominira *K. pneumoniae* klonskog tipa ST16. Veliki potencijal širenja ovog plazmida već je tada bio primjetan jer je s istekom istraživanja ovaj plazmid identificiran u ukupno 5 klonskih tipova *K. pneumoniae*.

Horizontalni prijenos gena koji kodiraju karbapenemaze u *E. coli* A15R bio je odgovoran za pojavu rezistencije na karbapeneme u transkonjugatima. Rezultati konjugacije idu u prilog dosadašnjim saznanjima koja prepoznaju plazmidnu prirodu karbapenemaza i važnost prijenosa rezistencije na karbapeneme horizontalnim putem (25, 56). Iako je proizvodnja karbapenemaza dosad prepoznata kao vrlo efikasan mehanizam rezistencije na karbapeneme i u ovom je radu uočeno da je prisutnost dodatnih mehanizama rezistencije, uz proizvodnju karbapenemaza, nužna kako bi se ispoljila klinički značajna rezistencija (26, 72). Varijabilna priroda rezistencije transkonjugata na karbapeneme proizlazi iz činjenice da *E. coli* A15R ne posjeduje dodatne mehanizme rezistencije i preuzimanje gena koji kodira

karbapenemazu horizontalnim putem nije dovoljno kako bi se ispoljila izražena rezistencija na karbapeneme.

Horizontalni prijenos gena koji kodiraju karbapenemaze, uz rezistenciju na karbapeneme, uzrokovao je i prijenos rezistencije na ostale klase antibiotika, prvenstveno na beta-laktame. Rezistencija na aminoglikozide i kombinaciju sulfonamida i trimetoprima primijećena je u većoj ili manjoj mjeri u svih transkonjugata osim onih koji su proizvodili OXA-48. Rezistencija transkonjugata na ostale klase beta-laktama ne iznenađuje s obzirom da karbapenemaze efikasno hidroliziraju peniciline, kombinaciju penicilina i inhibitora beta-laktamaza te cefalosporine (36). Osjetljivost OXA-48-producirajućih transkonjugata *E. coli* A15R na cefalosporine posljedica je vrlo specifičnog hidrolitičkog profila karbapenemaze OXA-48 koji ne uključuje ovu klasu beta-laktama (218).

Višestruko rezistentan fenotip koji je uočen kod analiziranih transkonjugata javlja se kao posljedica zajedničkog prijenosa više različitih gena za rezistenciju na antibiotike koji se nalaze na istom plazmidu. Uz gene koji kodiraju karbapenemaze KPC-2, VIM-1 i NDM-1, plazmidi su prvenstveno nosili i gene koji kodiraju beta-laktamaze, aminoglikozid-modificirajuće enzime i plazmidne varijante dihidropteroat sintaze. Visoka stopa vezanog horizontalnog prijenosa gena *aadA1* i *sul1* s genima koji kodiraju VIM-1 i NDM-1 učestala je pojava i posljedica je lokalizacije gena *bla*<sub>VIM-1</sub> u genskim kazetama integrona klase 1 što je već opisano ranije u raspravi (72, 139, 166, 167). Specifičan rezistom OXA-48-producirajućih transkonjugata *E. coli* A15R proizlazi iz karakterističnih svojstava IncL/M plazmida koji nosi gen *bla*<sub>OXA-48</sub>. Niti u jednom transkonjugatu, uz prijenos *bla*<sub>OXA-48</sub> nije zabilježen kotransfer drugih gena za rezistenciju na antibiotike. Spomenuto zapažanje proizlazi iz činjenice da ovaj plazmid, uz *bla*<sub>OXA-48</sub> ne nosi dodatne gene rezistencije na antibiotike (123, 217).

Iako su u većine plazmida koji nose gene za karbapenemaze detektirani i drugi geni za rezistenciju, višestruko rezistentan fenotip uočen u kliničkih izolata nije posljedica prisutnosti samo jednog plazmida u bakterijskoj stanici, što je naročito vidljivo u slučaju karbapenemaze OXA-48. Horizontalni prijenos plazmida koji nose gene za karbapenemaze uzrokovao je pojavu višestruko rezistentnog fenotipa *E. coli* A15R, no profil rezistencije transkonjugata sadržavao je užu spektar antibiotika u usporedbi s donorskim izolatima. Iako se geni koji kodiraju karbapenemaze nalaze na plazmidima, njihov se plazmidni kontekst ne može promatrati na jednak način. Raznolikost konjugativnih plazmida i lokalizacija gena *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>NDM-1</sub> na integronima i ostalim pokretnim genetičkim elementima pojačava doseg horizontalnog širenja u različitim geografskim područjima i ukazuje na veliki rizik prijenosa među bakterijama istih ili različitih vrsta.

Rezultati karakterizacije plazmida rasvjetljavaju, barem načelno, jedan od uzroka koji leže u pozadini poliklonskog širenja enterobakterija koje proizvode karbapenemaze. Šarolik spektar plazmida na kojima su smješteni geni koji kodiraju karbapenemaze, njihova dinamična priroda koja nije vezana za bakterijski kromosom, mobilnost i potencijal horizontalnog širenja neminovno dovode do povećanja genetičke varijabilnosti enterobakterija koje proizvode karbapenemaze. U isto vrijeme ne treba zanemariti svojevrsnu spregu koja je vidljiva između nekih plazmida i bakterijskih klonova. Takva sprega u ovom radu uočena je kod VIM-1 izolata *E. cloacae* klonskih tipova ST92, ST105 i ST200, te *bla*<sub>KPC-2</sub> plazmida IncFII<sub>s</sub> skupine inkompatibilnosti i klonskog tipa ST258 *K. pneumoniae*. Velika raznolikost u veličini plazmida u izolata *K. pneumoniae* vrlo je vjerojatno posljedica dinamičnih događaja kroz koje učestalo prolaze plazmidne DNA molekule, no njihova je raznolikost u isto vrijeme i posljedica dotoka novih plazmida kroz sveprisutnu pojavu horizontalnog prijenosa gena. Prisutnost gena *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>NDM-1</sub> na plazmidima IncN, IncA/C i IncL/M velikog potencijala širenja uvelike može utjecati na formiranje raznolikog plazmidnog profila unutar bakterija monoklonskog porijekla. Specifični slučaj čine plazmidi *bla*<sub>OXA-48</sub> IncL/M koji svoje globalno širenje mogu zahvaliti velikom potencijalu horizontalnog prijenosa. Na globalno širenje *bla*<sub>OXA-48</sub> može se gledati kao na pandemiju širenja promiskuitetne varijante plazmida IncL/M koju, u određenoj mjeri, potpomaže širenje visoko rizičnim epidemijskim klonovima enterobakterija. Plazmidi su bitan čimbenik koji doprinosi sveprisutnom širenju rezistencije na karbapeneme na globalnoj razini i nisu samo pasivan element koji putuje valom globalnog širenja visoko rizičnih klonova enterobakterija već su jedan od aktivnih pokretača tsunamija rezistencije na antibiotike.

Rezultati istraživanja provedeni u okviru ovog rada pružili su uvid u prevalenciju i epidemiologiju enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme na području Republike Hrvatske tijekom 2011. i 2012. godine. Istraživanje je također rasvijetlilo mehanizme rezistencije koji se nalaze u podlozi višestruke rezistencije izolata enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme. Iako je detektirana prisutnost četiri klinički najznačajnije karbapenemaze (KPC-2, VIM-1, NDM-1 i OXA-48), smanjena osjetljivost na karbapeneme u analiziranim kliničkim izolatima enterobakterija bazirala se na mehanizmima koji ne uključuju proizvodnju karbapenemaza što je uglavnom rezultiralo rezistencijom na ertapenem. Višestruka rezistencija analiziranih izolata enterobakterija posljedica je prisutnosti velikog broja različitih gena rezistencije na antibiotike koji su smješteni na različitim plazmidima. Iako je širenje enterobakterija koje proizvode karbapenemaze poliklonsko, u ovom je radu utvrđena sprega karbapenemaza i internacionalnih epidemijskih klonova

enterobakterija čime se uvelike povećava rizik od epidemijskog širenja rezistencije na karbapeneme na području Republike Hrvatske. Prisutnost rizičnih klonova enterobakterija i smještaj gena koji kodiraju karbapenemaze na već opisanim epidemijskim plazmidima upućuju na to da ni područje Republike Hrvatske nije pošteđeno trenda globalnog širenja enterobakterija rezistentnih na karbapeneme. Iako je u trenutku pisanja ovog rada vidljiv značajni vremenski odmak od perioda u kojem su prikupljeni analizirani izolati, rezultati ovog istraživanja daju jedinstveni uvid u mehanizme rezistencije, plazmidnu prirodu karbapenemaza i molekularnu epidemiologiju enterobakterija otpornih na karbapeneme na području Republike Hrvatske tijekom 2011. i 2012. godine i mogu poslužiti kao referentna točka u daljnjim istraživanjima ove vrste.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. Smanjena osjetljivost enterobakterija na karbapeneme, na području Republike Hrvatske, tijekom 2011. i 2012. godine nije bila dominantno posredovana proizvodnjom karbapenemaza već mehanizama koji se temelje na sinergiji smanjene propusnosti bakterijske stanice za karbapeneme i proizvodnje beta-laktamaza proširenog spektra.
2. Doseg rezistencije na karbapeneme ovisi o mehanizmu koji leži u podlozi rezistencije. Mehanizmi koji se temelje na smanjenoj propusnosti bakterijske stanice za karbapeneme uglavnom uzrokuju smanjenu osjetljivost na ertapenem. Proizvodnja karbapenemaza, uz smanjenu osjetljivost na ertapenem, uzrokuje značajno višu stopu rezistencije na imipenem i meropenem.
3. ESBL fenotip, detektiran u analiziranih izolata, posljedica je proizvodnje beta-laktamaze CTX-M-15. Statistički značajna povezanost proizvodnje CTX-M-15 i smanjene osjetljivosti na ertapenem zamijećena je u izolata *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze. Za razliku od *K. pneumoniae*, proizvodnja CTX-M-15 u izolata *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze nije pokazivala statistički značajnu povezanost.
4. Smanjena osjetljivost na karbapeneme koja se temelji na smanjenoj propusnosti bakterijske stanice, u analiziranih je izolata bila povezana sa sniženom ekspresijom gena koji kodiraju porinske kanale ompK35, odnosno ompC u vrste *K. pneumoniae*, odnosno *E. cloacae*.
5. Iako njihova proizvodnja nije bila dominantan mehanizam rezistencije na karbapeneme među enterobakterijama, u analiziranih je izolata zabilježena proizvodnja svih klinički najznačajnijih karbapenemaza – KPC-2, VIM-1, NDM-1, i OXA-48
6. Višestruko rezistentan fenotip odlikovao je analizirane izolate neovisno o mehanizmu rezistencije na karbapeneme i posljedica je prisutnosti velikog broja gena koji kodiraju gene za rezistenciju na različite klase antibiotika.
7. Sojevi enterobakterija koji proizvode karbapenemaze nisu monoklonskog porijekla, a njihova genetička pozadina ovisi o proučavanoj karbapenemazi i bakterijskoj vrsti.

8. Širenje karbapenemaze KPC-2 na području Republike Hrvatske tijekom 2011. i 2012. godine bilo je monoklonske prirode za koju je bio odgovoran klonski tip ST258 *K. pneumoniae*. Širenje karbapenemaza VIM-1, NDM-1 i OXA-48 bilo je poliklonske prirode pri čemu je vidljiva sprega između karbapenemaza i određenih bakterijskih klonova koji pokazuju povećani potencijal epidemijskog širenja.
9. U vrste *K. pneumoniae*, klonski tipovi ST15 i ST16 uglavnom su bili odgovorni za širenje karbapenemaza VIM-1, NDM-1 i OXA-48. U vrste *E. cloacae* glavni pokretači širenja karbapenemaze VIM-1 bili su klonski tipovi ST92, ST105 i ST200.
10. Klonsku strukturu enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze potrebno je razmatrati na razini bakterijske vrste. Iznimno niska genska raznolikost izolata *K. pneumoniae* posljedica je uspješnog širenja klonskog tipa ST437. Izolati *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze karakterizira izrazita poliklonalnost.
11. Geni koji kodiraju karbapenemaze smješteni su na plazmidima, a horizontalni prijenos ovih gena odgovoran je za prijenos višestruke rezistencije i varijabilne rezistencije na karbapeneme.
12. Geni koji kodiraju karbapenemaze KPC-2, VIM-1, NDM-1 nalaze se na plazmidima koji nose i gene rezistencije na ostale klase antibiotika, poglavito aminoglikozide i sulfonamide. Gen koji kodira karbapenemazu OXA-48 smješten je na plazmidu koji ne posjeduje dodatne gene rezistencije.
13. Poliklonska pozadina proizvodnje karbapenemaza posljedica je smještaja gena koji kodiraju karbapenemaze na različitim plazmidima velikog potencijala širenja među enterobakterijama iste ili različitih vrsta. Gen *bla*<sub>KPC-2</sub> identificiran je na FIIs, *bla*<sub>NDM-1</sub> na IncA/C, IncL/M i IncR, *bla*<sub>VIM-1</sub> na IncN i IncL/M dok je *bla*<sub>OXA-48</sub> detektiran na epidemijskom IncL/M plazmidu veličine ~60 kb.

**POPIS LITERATURE**

1. Thomson JM, Bonomo RA. 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol.* 8:518-24.
2. Hawkey PM, Jones AM. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 64 Suppl 1:i3-10.
3. Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. 2008. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy.* 28:235-49.
4. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y. 2010. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15.
5. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2013. *Medical microbiology.* 7th Edition ed. Elsevier/Saunders. Philadelphia
6. Murray PR, Baron EJ. 2007. *Manual of clinical microbiology.* 9th ed. ASM Press. Washington, D.C.
7. Tambić Andrašević A, Tambić T. 2016. Rezistencija bakterijskih izolata u 2015. godini. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2015. godini. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb
8. Livermore DM. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 27:128-42.
9. Canton R, Coque TM, Baquero F. 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis.* 16:315-25.
10. Wax RG. 2008. *Bacterial resistance to antimicrobials.* 2nd ed. CRC Press. Boca Raton
11. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:4943-60.
12. Tangden T, Giske CG. 2015. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 277:501-12.
13. Rapp RP, Urban C. 2012. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy.* 32:399-407.
14. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18:657-86.

15. Iovleva A, Doi Y. 2017. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med.* 37:303-315.
16. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 300:371-9.
17. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22:161-82, Table of Contents.
18. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. 1987. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet.* 2:302-6.
19. Jacoby GA. 1997. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am.* 11:875-87.
20. Paterson DL. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med.* 119:S20-8; discussion S62-70.
21. Pitout JD. 2008. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6:657-69.
22. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35:147-51.
23. Logan LK, Weinstein RA. 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 215:S28-S36.
24. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20:440-58, table of contents.
25. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 28:565-91.
26. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:5873-84.
27. Bedenic B, Mazzariol A, Plecko V, Bosnjak Z, Barl P, Vranes J, Cornaglia G. 2012. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother.* 24:237-9.
28. Jelic M, Butic I, Plecko V, Cipris I, Jajic I, Bejuk D, Koscak I, Marinkovic S, Pal MP, Andrasevic AT. 2016. KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Croatia: A Nationwide Survey. *Microb Drug Resist.* 22:662-667.

29. Novak A, Goic-Barisic I, Andrasevic AT, Butic I, Radic M, Jelic M, Rubic Z, Tonkic M. 2014. Monoclonal outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in intensive care unit, University Hospital Centre Split, Croatia. *Microb Drug Resist.* 20:399-403.
30. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 18.
31. Kocsis E, Savio C, Piccoli M, Cornaglia G, Mazzariol A. 2013. *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in Italy. *Clin Microbiol Infect.* 19:E409-11.
32. Jelic M, Skrlin J, Bejuk D, Koscak I, Butic I, Guzvinec M, Tambic-Andrasevic A. 2017. Characterization of Isolates Associated with Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *Microb Drug Resist.*
33. Mazzariol A, Bosnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenic B, Kalenic S, Cornaglia G. 2012. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis.* 18:532-4.
34. Nicolau DP. 2008. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 9:23-37.
35. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaeldin A. 2017. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 131:185-195.
36. Martinez-Martinez L, Gonzalez-Lopez JJ. 2014. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 Suppl 4:4-9.
37. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. 2015. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2:ofv050.
38. Martinez-Martinez L. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1:82-9.
39. Hong JH, Clancy CJ, Cheng S, Shields RK, Chen L, Doi Y, Zhao Y, Perlin DS, Kreiswirth BN, Nguyen MH. 2013. Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2147-53.

40. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 63:659-67.
41. Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. 2012. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol.* 50:223-6.
42. Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, Roman JC, Mora GC, Garcia P. 2012. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol.* 61:1270-9.
43. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH. 2015. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 70:81-8.
44. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:177-83.
45. Perez A, Canle D, Latasa C, Poza M, Beceiro A, Tomas Mdel M, Fernandez A, Mallo S, Perez S, Molina F, Villanueva R, Lasa I, Bou G. 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3247-53.
46. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF. 2014. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature.* 509:512-5.
47. Mayers DL, Lerner SA, Ouellette M, Sobel JD. 2009. *Antimicrobial drug resistance.* Infectious diseaseHumana Press. Totowa, N.J.
48. Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1-14.
49. Perez-Perez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2153-62.
50. Martinez-Martinez L, Pascual A, Conejo Mdel C, Garcia I, Joyanes P, Domenech-Sanchez A, Benedi VJ. 2002. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to



- extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:3926-32.
51. Oteo J, Miro E, Perez-Vazquez M, Navarro F. 2014. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 Suppl 4:17-23.
  52. Narayanan N, Johnson L, MacDougall C. 2016. Beyond Susceptible and Resistant, Part III: Treatment of Infections due to Gram-Negative Organisms Producing Carbapenemases. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 21:110-9.
  53. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J. 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 15.
  54. Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 20:821-30.
  55. Lopez-Cerero L, Almirante B. 2014. Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: reservoirs and transmission mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 Suppl 4:10-6.
  56. Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 303:298-304.
  57. Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. 2011. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 49:718-21.
  58. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 16:112-22.
  59. Philippon A, Slama P, Deny P, Labia R. 2016. A Structure-Based Classification of Class A beta-Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clin Microbiol Rev.* 29:29-57.
  60. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:969-76.
  61. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 18:306-25.
  62. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. 2007. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 60:470-82.

63. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H. 2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill.* 18.
64. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. 2017. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 17:101.
65. Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 67:1597-606.
66. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. 2016. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother.* 28:1-19.
67. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (version 1.0). 2013
68. Canton R, Canut A, Morosini MI, Oliver A. 2014. Breakpoints for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: is the problem solved? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 Suppl 4:33-40.
69. Grundmann H, Hori S, Tanner G. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol.* 39:4190-2.
70. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 17:1791-8.
71. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, Stokes HW. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 190:5095-100.
72. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN. 2005. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *J Clin Microbiol.* 43:5344-7.
73. Diene SM, Rolain JM. 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 20:831-8.

74. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 8:159-66.
75. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18:268-81.
76. Schultsz C, Geerlings S. 2012. Plasmid-mediated resistance in Enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* 72:1-16.
77. Fernandez-Martinez M, Miro E, Ortega A, Bou G, Gonzalez-Lopez JJ, Oliver A, Pascual A, Cercenado E, Oteo J, Martinez-Martinez L, Navarro F. 2015. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 46:157-63.
78. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 13:151-71.
79. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. 2011. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother.* 66:48-53.
80. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. 2008. Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2287-8.
81. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:232-60 ; second page, table of contents.
82. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. 2005. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1636-8.
83. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 22:664-89.
84. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 28:519-42.

85. Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol.* 49:397-401.
86. Spratt BG. 2004. Exploring the concept of clonality in bacteria. *Methods Mol Biol.* 266:323-52.
87. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 35:736-55.
88. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33:2233-9.
89. Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. 2005. Multilocus sequence typing: Data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol Biotechnol.* 29:245-54.
90. Tenover FC. 2007. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis.* 44:418-23.
91. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol.* 4:15.
92. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One.* 8:e66358.
93. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M. 2015. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 70:48-56.
94. Wyres KL, Holt KE. 2016. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* 24:944-956.
95. Adamczuk M, Zaleski P, Dziewit L, Wolinowska R, Nieckarz M, Wawrzyniak P, Kieryl P, Plucienniczak A, Bartosik D. 2015. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of beta-Lactam Resistance Genes among the Enterobacteriaceae. *Biomed Res Int.* 2015:414681.
96. Nordstrom K. 2006. Plasmid R1--replication and its control. *Plasmid.* 55:1-26.
97. Novick RP. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 51:381-95.

98. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. 2015. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One*. 10:e0123063.
99. Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. 65:2518-29.
100. Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 3:711-21.
101. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 63:219-28.
102. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 22:686-96.
103. Gamal D, Fernandez-Martinez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LA, Ocampo-Sosa AA, Martinez-Martinez L. 2016. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing *bla*<sub>NDM-1</sub> on IncR plasmids and its association with *rmtF*. *Int J Infect Dis*. 43:17-20.
104. Colinon C, Miriagou V, Carattoli A, Luzzaro F, Rossolini GM. 2007. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 60:258-62.
105. Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:2227-38.
106. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. 2016. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Updat*. 29:30-46.
107. Livermore DM. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*. 36:S11-23.
108. Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY. 2013. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int J Infect Dis*. 17:e1255-8.
109. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:15-22.
110. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their

- promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol Lett. 209:161-8.
111. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. 2006. qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 50:2872-4.
  112. Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother. 48:3996-4001.
  113. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 50:3953-5.
  114. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother. 52:1843-5.
  115. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 66:4555-8.
  116. Mosca A, Miragliotta L, Del Prete R, Tzakis G, Dalfino L, Bruno F, Pagani L, Migliavacca R, Piazza A, Miragliotta G. 2013. Rapid and sensitive detection of *bla*<sub>KPC</sub> gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. Springerplus. 2:31.
  117. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin Infect Dis. 39:55-60.
  118. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 43:4178-82.
  119. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PLoS One. 4:e4982.
  120. Landman D, Bratu S, Quale J. 2009. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol. 58:1303-8.

121. Szabo D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL. 2006. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:2833-5.
122. Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.* 63:274-81.
123. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:559-62.
124. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. 2006. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:2990-5.
125. Mirelis B, Rivera A, Miro E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. 2006. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24:370-2.
126. Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. 2008. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-beta-lactamase production in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 61:548-53.
127. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. 2008. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 62:102-5.
128. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. 2008. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 46:4083-6.
129. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3365-70.
130. Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, Xu B. 2013. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 10:2720-31.

131. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 241:129-34.
132. Casali N, Preston A. 2003. *E. coli plasmid vectors : methods and applications.* Methods in molecular biology Humana Press. Totowa, N.J.
133. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 226:235-40.
134. Sirichote P, Hasman H, Pulsrikarn C, Schonheyder HC, Samulioniene J, Pornruangmong S, Bangtrakulnonth A, Aarestrup FM, Hendriksen RS. 2010. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. *J Clin Microbiol.* 48:883-8.
135. Villa J, Viedma E, Branas P, Orellana MA, Otero JR, Chaves F. 2014. Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmid. *Int J Antimicrob Agents.* 43:451-5.
136. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A, Cafiso V, Amicosante G, Stefani S, Venditti M. 2009. Infections with VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol.* 47:3514-9.
137. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. 2014. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 69:2091-7.
138. Chung HS, Yong D, Lee M. 2016. Mechanisms of ertapenem resistance in Enterobacteriaceae isolates in a tertiary university hospital. *J Investig Med.* 64:1042-9.
139. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Canton R. 2007. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 45:1171-8.
140. Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. 2006. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother.* 58:669-72.
141. Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Orlandou K, Giamarellou H. 2005. Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother.* 55:634-8.



142. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC. 2003. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol.* 41:3893-6.
143. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. 2017. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 15:519-526.
144. Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, Press EG, Iovine NM, Townsend BM, Wagener MM, Kreiswirth B, Nguyen MH. 2014. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:4443-51.
145. Endimiani A, Perez F, Bonomo RA. 2008. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6:805-24.
146. Newire EA, Ahmed SF, House B, Valiente E, Pimentel G. 2013. Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 12:16.
147. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. 2011. Genetic features of bla<sub>NDM-1</sub>-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:5403-7.
148. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, Perez-Vazquez M, Fernandez-Garcia MD, Delgado-Iribarren A, Sanchez-Romero I, Garcia-Picazo L, Miguel MD, Solis S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. 2013. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 68:317-21.
149. Petrosillo N, Vranic-Ladavac M, Feudi C, Villa L, Fortini D, Barisic N, Bedenic B, Ladavac R, D'Arezzo S, Andrasevic AT, Capone A. 2016. Spread of *Enterobacter cloacae* carrying bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>SHV-12</sub> and plasmid-mediated quinolone resistance genes in a surgical intensive care unit in Croatia. *J Glob Antimicrob Resist.* 4:44-8.
150. Bedenic B, Sardelic S, Luxner J, Bosnjak Z, Varda-Brkic D, Lukic-Grlic A, Marekovic I, Francula-Zaninovic S, Krilanovic M, Sijak D, Grisold A, Zarfel G. 2016. Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of

- dissemination and emergence of class d carbapenemases in Enterobacteriaceae from Croatia. *Infect Genet Evol.* 43:74-82.
151. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. 2012. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 67:1660-5.
  152. Castanheira M, Sader HS, Jones RN. 2010. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 16:61-5.
  153. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fielt J, Herda M, Bojarska K, Zabicka D, Kania-Pudlo M, Mlynarczyk G, Zak-Pulawska Z, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2011. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:5493-9.
  154. Lou Z, Qi Y, Qian X, Yang W, Wei Z. 2014. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 in Hangzhou, China. *Chin Med J (Engl).* 127:528-31.
  155. Bedenic B, Zujic-Atalic V, Jajic I, Djuras-Cuculic B, Godic-Torkar K, Vranes J, Zarfel G, Grisold A. 2015. Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase in Croatian University Hospital. *J Chemother.* 27:241-5.
  156. Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, Tissari P, Vuorenoja K, Hakanen AJ, Vaara M, Jalava J. 2009. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill.* 14.
  157. Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. 2009. Detection of aac(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother.* 64:718-22.
  158. Miro E, Grunbaum F, Gomez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. 2013. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist.* 19:94-9.
  159. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 57:138-63.
  160. Ho PL, Leung LM, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Ng TK. 2016. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among

- aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates. *J Microbiol Immunol Infect.* 49:123-6.
161. El-Badawy MF, Tawakol WM, El-Far SW, Maghrabi IA, Al-Ghamdi SA, Mansy MS, Ashour MS, Shohayeb MM. 2017. Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int J Microbiol.* 2017:8050432.
  162. Shaw KJ, Hare RS, Sabatelli FJ, Rizzo M, Cramer CA, Naples L, Kocsi S, Munayyer H, Mann P, Miller GH, et al. 1991. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 35:2253-61.
  163. Xiao Y, Hu Y. 2012. The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microb Drug Resist.* 18:42-6.
  164. Haidar G, Alkroud A, Cheng S, Churilla TM, Churilla BM, Shields RK, Doi Y, Clancy CJ, Nguyen MH. 2016. Association between the Presence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and In Vitro Activity of Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, and Plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- and Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Enterobacter* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:5208-14.
  165. Kosmidis C, Giannopoulou M, Flountzi A, Markogiannakis A, Goukos D, Petrikkos G, Daikos GL, Tzanetou K. 2013. Genetic basis of aminoglycoside resistance following changes in aminoglycoside prescription patterns. *J Chemother.* 25:217-21.
  166. Tato M, Coque TM, Baquero F, Canton R. 2010. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:320-7.
  167. Vatopoulos A. 2008. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 13.
  168. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, Pitout JDD. 2017. Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.*
  169. Zhao WH, Hu ZQ. 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 39:79-101.

170. Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. 2014. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. PLoS One. 9:e99209.
171. Grape M, Farra A, Kronvall G, Sundstrom L. 2005. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 11:185-92.
172. Chavda KD, Chen L, Fouts DE, Sutton G, Brinkac L, Jenkins SG, Bonomo RA, Adams MD, Kreiswirth BN. 2016. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. MBio. 7.
173. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. 2014. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. Int J Antimicrob Agents. 44:260-2.
174. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Donhofer A, Wilson DN. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biol Chem. 395:559-75.
175. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. MBio. 8.
176. Aschbacher R, Doumith M, Livermore DM, Larcher C, Woodford N. 2008. Linkage of acquired quinolone resistance (qnrS1) and metallo-beta-lactamase (blaVIM-1) genes in multiple species of Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy. J Antimicrob Chemother. 61:515-23.
177. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 51:1223-7.
178. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol. 7:887-902.
179. Miro E, Segura C, Navarro F, Sorli L, Coll P, Horcajada JP, Alvarez-Lerma F, Salvado M. 2010. Spread of plasmids containing the bla(VIM-1) and bla(CTX-M) genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. J Antimicrob Chemother. 65:661-5.
180. Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. 2006. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sulI*-type integron in the newly

- described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3200-2.
181. Zujic Atalic V, Bedenic B, Kocsis E, Mazzariol A, Sardelic S, Barisic M, Plecko V, Bosnjak Z, Mijac M, Jajic I, Vranic-Ladavac M, Cornaglia G. 2014. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia--the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 20:O894-903.
182. Melegh S, Kovacs K, Gam T, Nyul A, Patko B, Toth A, Damjanova I, Mestyan G. 2014. Emergence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone in the Clinical Centre University of Pecs, Hungary. *Clin Microbiol Infect.* 20:O27-9.
183. Nielsen JB, Skov MN, Jorgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schonning K. 2011. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:773-8.
184. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A, Randrianirina F, Thiberge JM, Kinana A, Dufougeray A, Perrier-Gros-Claude JD, Boisier P, Garin B, Brisse S. 2013. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect.* 19:349-55.
185. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Fuzi M. 2008. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* 62:978-85.
186. Bogaerts P, Bouchahrouf W, de Castro RR, Deplano A, Berhin C, Pierard D, Denis O, Glupczynski Y. 2011. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3036-8.
187. Kocsis E, Guzvinec M, Butic I, Kresic S, Crnek SS, Tambic A, Cornaglia G, Mazzariol A. 2016. blaNDM-1 Carriage on IncR Plasmid in Enterobacteriaceae Strains. *Microb Drug Resist.* 22:123-8.
188. Sanchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Munoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, Alvarez-Avello J, Balandin-Moreno B, Cuevas O, Fernandez-Romero S, Azanedo L, Saez D, Campos J. 2012. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella*

- pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:420-7.
189. Rodrigues C, Novais A, Machado E, Peixe L. 2014. Detection of VIM-34, a novel VIM-1 variant identified in the intercontinental ST15 *Klebsiella pneumoniae* clone. *J Antimicrob Chemother.* 69:274-5.
190. Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernandez-Martinez M, Gonzalez-Lopez JJ, Martinez-Garcia L, Martinez-Martinez L, Merino M, Miro E, Mora M, Navarro F, Oliver A, Pascual A, Rodriguez-Bano J, Ruiz-Carrascoso G, Ruiz-Garbajosa P, Zamorano L, Bautista V, Perez-Vazquez M, Campos J. 2015. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:3406-12.
191. Dhar S, Martin ET, Lephart PR, McRoberts JP, Chopra T, Burger TT, Tal-Jasper R, Hayakawa K, Ofer-Friedman H, Lazarovitch T, Zaidenstein R, Perez F, Bonomo RA, Kaye KS, Marchaim D. 2016. Risk Factors and Outcomes for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolation, Stratified by Its Multilocus Sequence Typing: ST258 Versus Non-ST258. *Open Forum Infect Dis.* 3:ofv213.
192. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. 2011. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis.* 17:103-6.
193. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. 2015. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. *Euro Surveill.* 20.
194. Lunha K, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, Chaimanee P, Angkititrakul S, Chetchotisakd P. 2016. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 85:221-6.
195. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalie L, van der Mee-Marquet N, de Champs C, Aissa N, Eloy C, Blanc V, Guyeux C, Hocquet D, Lavigne JP, Bertrand X. 2014. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect.* 20:O1121-3.
196. Giske CG, Froding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, Woodford N, Walsh TR. 2012. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae*

- contribute to the dissemination of *bla*<sub>NDM-1</sub> in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:2735-8.
197. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. 2011. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:2420-3.
  198. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2015. Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 81:264-8.
  199. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Canton R, Darini AL, Coque TM. 2011. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3579-83.
  200. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Perez-Blanco V, Mingorance J, Gomez-Gil R, Herruzo R, Perez-Vazquez M, Astray J, Garcia-Rodriguez J, Ruiz-Velasco LM, Campos J, de Burgos C, Ruiz-Carrascoso G. 2015. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 46:169-73.
  201. Chudackova E, Bergerova T, Fajfrlik K, Cervena D, Urbaskova P, Empel J, Gniadkowski M, Hrabak J. 2010. Carbapenem-nonsusceptible strains of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 and/or DHA-1 beta-lactamases in a Czech hospital. *FEMS Microbiol Lett.* 309:62-70.
  202. Marcade G, Brisse S, Bialek S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Passet V, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. 2013. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol Infect.* 141:1705-12.
  203. Frasson I, Lavezzo E, Franchin E, Toppo S, Barzon L, Cavallaro A, Richter SN, Palu G. 2012. Antimicrobial treatment and containment measures for an extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 isolate carrying pKPN101-IT, a novel fully sequenced *bla*(KPC-2) plasmid. *J Clin Microbiol.* 50:3768-72.
  204. Melegh S, Schneider G, Horvath M, Jakab F, Emody L, Tigyi Z. 2015. Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 62:233-45.

205. Diestra K, Miro E, Marti C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F. 2011. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect.* 17:1032-6.
206. Johnson AP, Woodford N. 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 62:499-513.
207. Ivanovski N, Masin J, Rambabova-Busljetic I, Pusevski V, Dohcev S, Ivanovski O, Popov Z. 2011. The outcome of commercial kidney transplant tourism in Pakistan. *Clin Transplant.* 25:171-3.
208. Dortet L, Flonta M, Boudehen YM, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, Naas T. 2015. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:7100-3.
209. Pecora ND, Li N, Allard M, Li C, Albano E, Delaney M, Dubois A, Onderdonk AB, Bry L. 2015. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. *MBio.* 6:e01030.
210. Knopp M, Andersson DI. 2015. Amelioration of the Fitness Costs of Antibiotic Resistance Due To Reduced Outer Membrane Permeability by Upregulation of Alternative Porins. *Mol Biol Evol.* 32:3252-63.
211. Lohr IH, Hultner N, Bernhoff E, Johnsen PJ, Sundsfjord A, Naseer U. 2015. Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. *PLoS One.* 10:e0116516.
212. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1485-93.
213. Toth A, Kocsis B, Damjanova I, Kristof K, Janvari L, Paszti J, Cserecsik R, Topf J, Szabo D, Hamar P, Nagy K, Fuzi M. 2014. Fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones is diverse across clones of *Klebsiella pneumoniae* and may select for CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33:837-43.
214. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouvelekis LS. 2008. Ongoing epidemic of bla<sub>VIM-1</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 61:59-63.



215. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM. 2006. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis.* 12:1145-8.
216. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. 2011. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 17:E24-6.
217. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2014. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:467-71.
218. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gerard M, Verbruggen AM, Deplano A, Denis O, Bogaerts P. 2012. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 39:168-72.

## ŽIVOTOPIS

Rođen sam 12. ožujka 1985. u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završavam u Velikoj Gorici. Studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta sveučilišta u Zagrebu upisujem 2003. godine. Diplomirao sam 29. siječnja 2009. obranom diplomskog rada pod nazivom "Filostratigrafijska analiza genoma kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*)" izrađenog pod vodstvom doc.dr.sc Tomislava Domazeta-Loše na Institutu Ruđer Bošković.

Poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutske znanosti“ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2010. godine.

Od 15. kolovoza 2009. zaposlen sam na Odjelu za bakteriologiju i bolničke infekcije Zavoda za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. U početku radim kao znanstveni novak na projektu „Detekcija i karakterizacija uzročnika bakterijskih meningitisa i pneumonija“ (MZOŠ 143-1080002-0101), voditeljice prof. dr. sc. Arjane Tambić-Andrašević, a od 1. veljače 2016. kao redoviti zaposlenik Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“.

U sklopu redovitog rada u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku, uz rutinski rad u dijagnostici, uvodim *de novo* metode molekularne detekcije invazivnih bakterijskih uzročnika u rutinsku bakteriološku dijagnostiku. U sklopu Referentnog centra za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike pri Klinici za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ zadužen sam za uvođenje i provođenje fenotipskih i molekularno-bioloških metoda identifikacija mehanizama rezistencije, te tipizacije kliničkih izolata različitih bakterijskih vrsta.

Uz navedeno sam uključen, kao vanjski suradnik, u projekt „Kronične upalne bolesti crijeva u djece: incidencija, tijek bolesti te uloga prehrane i crijevnih mikroflora u etiopatogenezi“ Hrvatske zaklade za znanost, pod voditeljstvom izv.prof.dr.sc Sanje Kolaček dr. med. (Broj projekta: 3788).

Član sam Europskog društva kliničke mikrobiologije i infektivnih bolesti (eng. „European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases“, ECMID) i sekcije ESGARS (eng. „European Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance“) koja djeluje u sklopu ESCMID-a.

## BIBLIOGRAFIJA AUTORA

### POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA:

1. **Jelić M**, Škrilin J, Bejuk D, Koščak I, Butić I, Gužvinec M, Tambić Andrašević A. Characterization of Isolates Associated with Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *Microbial Drug Resistance*. 2017 Dec 21. doi: 10.1089/mdr.2017.0168. [Epub ahead of print]
2. Brkić DV, Pristaš I, Cipriš I, **Jelić M**, Butić I, Tambić Andrašević A. Successful containment of the first KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Croatia. *Future Microbiol*. 2017 Sep;12:967-974
3. **Jelić M**, Butić I, Plečko V, Cipriš I, Jajić I, Bejuk D, Koščak I, Marinković S, Payerl-Pal M, Andrašević-Tambić A. KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Croatia: A nationwide survey. *Microbial Drug Resistance*. 22 (2016) , 8; 662-667
4. Gužvinec M, Izdebski R, Butić I, **Jelić M**, Abram M, Koščak I, Baraniak A, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Tambić Andrašević A. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia . *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 58 (2014) , 10; 6277-6283
5. Novak A, Goić Barišić I, Tambić Andrašević A, Butić I, Radić M, **Jelić M**, Rubić Ž, Tonkić m. Monoclonal Outbreak of VIM-1-Carbapenemase- Producing *Enterobacter cloacae* in Intensive Care Unit, University Hospital Centre Split, Croatia. *Microbial drug resistance-mechanisms epidemiology and disease*. 20 (2014) , 5; 399-403

### POPIS OBJAVLJENIH RADOVA U STRUČNIM ČASOPISIMA:

1. Gužvinec, Marija; Butić, Iva; **Jelić, Marko**; Bukovski, Suzana; Lucić, Sandra; Tambić Andrašević, Arjana. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. // *Infektološki glasnik : znanstveno-stručni časopis za infektologiju*. 32 (2012) ; 71-80 (pregledni rad, stručni).
2. Tambić Andrašević, Arjana; **Jelić, Marko**; Gužvinec, Marija; Butić, Iva; Bukovski, Suzana. Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. // *Infektološki glasnik : znanstveno-stručni časopis za infektologiju*. 32 (2012) , 2; 45-52 (pregledni rad, stručni).

## KONGRESNA PRIOPĆENJA:

1. Rubic Z, Soprek S, **Jelic M**, Novak A, Goic-Barisic I, Radic M, Tambic-Andrasevic A, Tonkic M. *In vitro* antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* coproducing TEM-116 and CMY-16  $\beta$ -lactamases. ECCMID. Travanj 2015
2. Dusek D, Mravak Stipetic M, Grce M, Pulanic D, Grkovic L, Serventi Seiwerth R, Klepac Pulanic T, Ceovic R, Bukovski S, **Jelic M**, Cindric M, Raic LJ, Bilic E, Peric Z, Durakovic N, Vince A, Vrhovac R, Pavletic SZ, Nemet D. Oral *Candida* species colonization in chronic Graft-versus-Host Disease. 41st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Ožujak 2015
3. **Jelić M**, Gužvinec M, Butić I, Bukovski S, Tambić-Andrašević A. Prevalence of qnr genes in 1032 invasive isolates of *Escherichia coli* in Croatia. ECCMID. Svibanj 2014.
4. Rubic Z, Soprek S, **Jelic M**, Radic M, Novak A, Goic-Barisic I, Tonkic M, Tambic-Andrasevic A. The first detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from University Hospital centre Split, Croatia. ECCMID. Svibanj 2014.
5. Bukovski S, Tambić Andrašević A, **Jelić M**, Gužvinec M. Nine year history of *Neisseria meningitidis* groups, diagnostic methods and antibiotic sensitivity profile. 12th EMGM Meeting Bad Liopersdorf, Austrija, 2013
6. Butić I; Gužvinec M; Bukovski S; **Jelić M**; Pristaš I, Tambić Andrašević A. Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal isolates in children < 14 years of age in Croatia, 2005 to 2009. 30th Annual Meeting of the European Society for Paediatrics Infectious Diseases. Svibanj 2012.
7. Bukovski S, **Jelić M**, Gužvinec M; Groš I, Lucić S, Čeljuska-Tošev E, Tambić Andrašević A. 2010 - View at invasive bacterial diseases at University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević" Zagreb, Croatia . 11th EMGM Congress 2011. Svibanj 2011

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## MEHANIZMI REZISTENCIJE U ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME

**Marko Jelić**

Odjel za bakteriologiju i bolničke infekcije, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“

### SAŽETAK

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem da se utvrde mehanizmi rezistencije na karbapeneme, njihova prevalencija, pozadina višestruke rezistencije i epidemiološke poveznice među izolatima enterobakterija koji su pokazivali smanjenu osjetljivost na karbapeneme na području Republike Hrvatske tijekom 2011. i 2012. godine. Od 250 prikupljenih izolata, iz 22 mikrobiološka laboratorija, većina je pripadala vrstama *K. pneumoniae* (60,4 %) i *E. cloacae* (33,2 %). Analizirani izolati bili su višestruko rezistentni s varijabilnom stopom rezistencije na karbapeneme. 65,6 % izolata nije proizvodilo karbapenemaze iako je u analiziranoj zbirci detektirana proizvodnja karbapenemaza KPC-2, VIM-1, NDM-1 i OXA-48. Smanjena osjetljivost na ertapenem temeljena na smanjenoj propusnosti bakterijske stanice u izolata *K. pneumoniae* bila je povezana sa sniženom ekspresijom gena *ompK35* i proizvodnjom beta-laktamaze CTX-M-15, dok je u izolata *E. cloacae* uočena snižena ekspresija gena *ompC*. Utvrđeno je poliklonsko širenje karbapenemaza, uz iznimku karbapenemaze KPC-2 čije je širenje povezano s klonom ST258 *K. pneumoniae*. Širenje karbapenemaze VIM-1 među *E. cloacae* povezano je s klonskim tipovima ST92, ST200 i ST105. Klonski tipovi ST15 i ST16 *K. pneumoniae* glavni su pokretač širenja karbapenemaza VIM-1, NDM-1 i OXA-48. Širenje enterobakterija koje ne proizvode karbapenemaze bilo je polklonsko, no genetička varijabilnost je ovisila o promatranjnoj bakterijskoj vrsti. Izolati *E. cloacae* koji ne proizvode karbapenemaze pokazivali su povećanu genetičku raznolikost, dok je smanjena raznolikost izolata *K. pneumoniae* bila posljedica širenja klonskog tipa ST437. Geni koji kodiraju karbapenemaze smješteni su na plazmidima pri čemu je gen *bla*<sub>KPC-2</sub> identificiran na plazmidima FIIIs, *bla*<sub>NDM-1</sub> na IncA/C, IncL/M i IncR, *bla*<sub>VIM-1</sub> na IncN i IncL/M i *bla*<sub>OXA-48</sub> na epidemijskom IncL/M plazmidu veličine ~60 kb. Pojava i širenje enterobakterija otpornih na karbapeneme je problem globalnih razmjera koji nije zaobišao niti Republiku Hrvatsku. Mehanizmi rezistencije na antibiotike enterobakterija otpornih na karbapeneme analiziranih u ovom radu i njihov epidemiološki kontekst u skladu su s općom slikom rezistencije enterobakterija na karbapeneme koja se opisuje u znanstvenoj literaturi.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 191 stranicu, 37 slika, 32 tablice, 218 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Enterobacteriaceae*, otpornost na karbapeneme, karbapenemaze, molekularna epidemiologija, plazmidi, KPC-2, VIM-1, NDM-1, OXA-48

Mentor: **Dr. sc.** Arjana Tambić Andrašević, *redoviti profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

Ocjenjivači: **Dr. sc.** Gordana Maravić Vlahoviček, *izvanredni profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

**Dr. sc.** Maja Šegvić Klarić, *izvanredni profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

**Dr. sc.** Ana Budimir, *izvanredni profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

Rad prihvaćen: 23. svibnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

### MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CARBAPENEM- RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE

**Marko Jelić**

**Department of Clinical Microbiology, University Hospital for Infectious Diseases**

### SUMMARY

The aim of this study was to identify and assess the prevalence of resistance mechanisms underlying carbapenem resistance, to investigate multidrug resistance and to elucidate genetic relatedness among carbapenem non-susceptible enterobacterial isolates collected during 2011 and 2012 in Croatia. Out of 250 isolates collected from 22 clinical microbiology laboratories, most were *K. pneumoniae* (60.4 %) and *E. cloacae* (33,2 %). All isolates were multiple drug resistant and showed varying levels of resistance to carbapenems. In 65.6 % of isolates carbapenem non-susceptibility was not exhibited via carbapenemase production even though KPC-2, VIM-1, NDM-1 and OXA-48 production was observed. Ertapenem non-susceptibility due to reduced permeability in *K. pneumoniae* isolates was associated with *ompK35* gene repression and CTX-M-15 production, while in *E. cloacae* isolates *ompC* gene repression was observed. Carbapenemase dissemination was polyclonal with exception of KPC-2 which was propagated exclusively by the spread of ST258 *K. pneumoniae* clone. Spread of VIM-1-producing *E. cloacae* was mainly associated with ST92, ST200 and ST105 clones. ST15 and ST16 *K. pneumoniae* clones were recognized as a main reservoir of *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> genes. Spread of carbapenemase non-producing Enterobacteriaceae was polyclonal but genetic diversity of isolates was species specific. Carbapenemase non-producing *E. cloacae* exhibited greater genetic variability, but in *K. pneumoniae* homogenous genetic background was associated with successful clonal spread of ST437. Plasmid localization of all carbapenemase encoding genes was observed. *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was detected on FII plasmids, *bla*<sub>NDM-1</sub> on IncA/C, IncL/M and IncR, *bla*<sub>VIM-1</sub> on IncN and IncL/M and *bla*<sub>OXA-48</sub> on an IncL/M ~60 kb epidemic plasmid. Emergence and spread of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae is a global healthcare problem which is also recognized in Croatia. Mechanisms of carbapenem resistance and epidemiological background of isolates observed in this study is consistent with reports describing carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae on a global level.

Thesis is deposited in the Central library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 191 pages, 37 figures, 32 tables and 218 references. Original is in Croatian language

Keywords: Enterobacteriaceae, carbapenem non-susceptible, carbapenemases, molecular epidemiology, plasmids, KPC-2, VIM-1, NDM-1, OXA-48

Supervisor: Arjana Tambić Andrašević, **Ph.D.**, Full Professor, School of Medicine, University of Zagreb

Reviewers: Gordana Maravić Vlahoviček, **Ph.D.**, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb  
Maja Šegvić Klarić, **Ph.D.**, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb  
Ana Budimir, **Ph.D.**, Associate Professor, School of Medicine, University of Zagreb

Thesis accepted: 23<sup>rd</sup> May 2018