

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BAKTERIJE SA STEČENOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE
IZOLIRANE IZ OTPADNIH VODA

BACTERIA WITH ACQUIRED RESISTANCE TO ANTIBIOTICS
RECOVERED FROM WASTEWATERS

SEMINARSKI RAD

Lea Vrbančić

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate study of biology

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. UROĐENA REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE.....	2
3. STEČENA REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE.....	4
4. BAKTERIJE S VIŠESTRUKOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE.....	8
5. NALAZI BAKTERIJA SA STEČENOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE U OTPADNIM VODAMA.....	10
6. OTPADNE VODE KAO MEDIJ ZA PRAĆENJE BAKTERIJA SA STEČENOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE U ZDRAVOJ POPULACIJI.....	14
7. ZAKLJUČAK.....	17
8. LITERATURA.....	18
9. SAŽETAK.....	20
10. SUMMARY.....	21

1. UVOD

U 19. je stoljeću dokazano da bolesti mogu biti uzrokovane mikroorganizmima koji uključuju bakterije, gljivice i praživotinje te viruse. Bakterije su jednostanični prokariotski organizmi s dobro razvijenom staničnom stijenkom te bez prave jezgre i organela. Neke bakterije, zbog svojih genetičkih i fizioloških osobina, imaju potencijalnu sposobnost izazivanja zaraznih bolesti u živom organizmu. Pacijenti oboljeli od bakterijskih infekcija imali su male šanse za preživljavanje sve do otkrića prvog antibiotika – penicilina. Godine 1928. Sir Alexander Fleming otkrio je da plijesan roda *Penicillium* proizvodi tvar penicilin koja ubija bakterije. Nakon penicilina, tijekom godina otkriveni su i proizvedeni mnogi antibiotici čije je korištenje doprinijelo poboljšanju ljudskog zdravlja te produljilo očekivani životni vijek. Od početka korištenja antibiotika postojale su bakterije otporne na neke od njih. Stalnim i relativno brzim otkrivanjem novih antibiotika takve bakterije nisu predstavljale veliki problem, no nažalost, takvo stanje nije potrajalo. U današnje su vrijeme bakterije otporne na antibiotike postale globalni zdravstveni problem. Istraživanja takvih bakterija usredotočena su na pronalaženje načina za smanjenje njihova broja, sprječavanje širenja takvih bakterija u okoliš te sprečavanje razvoja novih mehanizama rezistencije na antibiotike. Cilj ovog rada je objasniti problem bakterijske rezistencije na antibiotike, dati pregled na koje načine bakterije mogu postati rezistentne na antibiotike te okarakterizirati otpadne vode kao nalazište ovih bakterija.

2. UROĐENA REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Antibiotici su lijekovi selektivno toksični za bakterije, a netoksični ili slabo toksični za organizam domaćina. Antibiotici mogu biti modificirani prirodni spojevi izolirani iz nekih bakterija i gljivica ili sintetički lijekovi. Prema mehanizmu djelovanja na bakterijske stanice dijelimo ih na četiri skupine: antibiotici koji djeluju na bakterijsku staničnu stijenku, oni koji djeluju na citoplazmatsku membranu, inhibitori sinteze proteina te inhibitori sinteze nukleinskih kiselina. Unutar ove podjele, antibiotici se dalje dijele prema njihovoj kemijskoj strukturi. Na bakterijsku staničnu stijenku djeluju betalaktamski antibiotici (penicilin, cefalosporini, monobaktami i karbapenemi), glikopeptidini antibiotici i bacitracin; na funkciju citoplazmatske membrane djeluju polimksini; na sintezu proteina utječu aminoglikozidi, kloramfenikol, tetraciklini, makrolidi, inkozamidi, streptogramini i oksazolidinoni; a na sintezu nukleinskih kiselina djeluju kinoloni, rimfampicini, metronidazol, treimetoprim, sulfonamidi te nitrofurantoin (Kalenić i sur. 2013).

Rezistencija bakterija na antibiotike podrazumijeva sposobnost bakterija da preživi djelovanje antibiotika. Razina rezistencije izražava se vrijednostima minimalne koncentracije antibiotika koja izaziva vidljivu inhibiciju rasta bakterija, tj. MIC-om (eng. *minimal inhibitory concentration*). Bakterijska rezistencija na antibiotike može se postići na više načina te jedna bakterijska stanica može istovremeno imati nekoliko različitih mehanizama rezistencije, no većinom bakterije "preferiraju" određeni mehanizam. Mehanizmi rezistencije se mogu podijeliti u tri glavne skupine: modifikacije ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, djelovanje na unos ili izbacivanje antibiotika iz stanice, te najčešći i najefikasniji mehanizam, proizvodnju enzima koji razgrađuju ili modificiraju antibiotik. Mehanizmi rezistencije mogu biti prirođeni bakteriji ili ih ona može steći pa razlikujemo urođenu ili primarnu te stečenu ili sekundarnu rezistenciju (Duvančić 2019).

Urođena ili primarna rezistencija razvila se kao posljedica normalnih strukturnih, fizioloških i genetskih karakteristika bakterija. Urođena rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika, koji označava skupinu odnosno skupine bakterija na koje neki antibiotik djeluje. Primjeri urođene rezistencije su građa stanične stijenke Gram negativnih bakterija, nedostatak ciljnog mjesta za vezanje antibiotika, nemogućnost ulaska antibiotika u bakterijsku stanicu te urođena proizvodnja enzima koji inaktiviraju antibiotik.

Stanična stijenka bakterija građena je od peptidoglikana te stanici daje čvrstoću, oblik te sprječava da se stanica rasprsne uslijed osmotskog tlaka. Prema građi stanične stijenke

bakterije se, uz iznimke, dijele na dvije velike skupine – Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Za razliku od Gram pozitivnih bakterija, Gram negativne bakterije imaju tanak sloj peptidoglikana u periplazmatskom prostoru te imaju dodatnu vanjsku membranu. Vanjska membrana čini stanice Gram negativnih bakterija manje propusnima te posljedično rezistentnima na mnoge antibiotike (Kalenić i sur. 2013).

Enterococcus, rod Gram pozitivnih kuglastih bakterija, primjer je urođene rezistencije radi nedostatka ciljnog mjesta za vezanje antibiotika. Enterokoki su prirodno rezistentni na cefalosporine koji se vežu na specifične proteine u peptidoglikanu stanične stijenke koje ovaj rod bakterija nema (EUCAST 2016, Abram i sur. 2018).

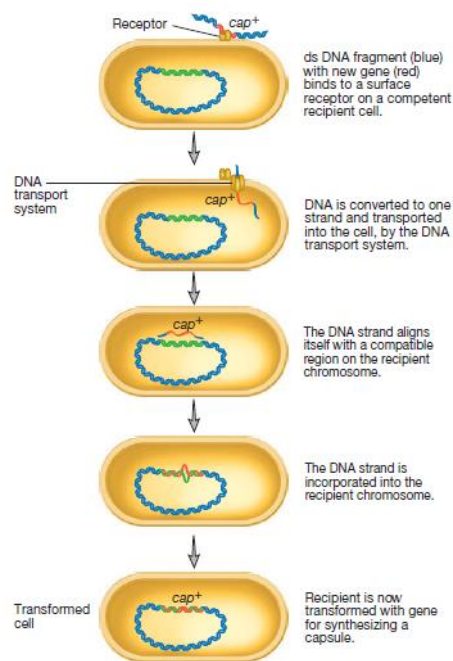
Neke bakterije prirodno proizvode enzime koji inaktiviraju određene antibiotike modifikacijom ili razgradnjom. Geni koji kodiraju za te enzime mogu se nalaziti na nukleoidu, bakterijski kromosom, ili plazmidu. Plazmid je kružna dvostruka molekula DNA koja se replicira neovisno o bakterijskom kromosomu. U stanici se može nalaziti više različitih plazmida istovremeno, a geni na njima nisu nužni za normalan metabolizam stanice. Primjer za ovaj mehanizam urođene rezistencije su vrste roda *Klebsiella* koje su prirodno otporne na betalaktamski antibiotik ampicilin zbog proizvodnje beta-laktamaza koje uništavaju lijek prije nego što se uspije vezati za svoja ciljna mjesta (EUCAST 2016, Abram i sur. 2018).

3. STEČENA REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Stečena ili sekundarna rezistencija rezultat je prirodnih mutacija bakterijskog genoma ili horizontalnog prijenosa gena. Bakterija može postati rezistentna na određeni antibiotik mutacijom u genu ili genima uključenima u mehanizam djelovanja tog antibiotika. Na primjer, točkaste mutacije gena koji kodira ciljno mjesto antibiotika dovodi do nemogućnosti njegovog vezanja za stanicu te posljedično djelovanja na nju, tj. ta bakterijska stanica postaje rezistentna na taj antibiotik ili skupinu antibiotika. Ako bakterije sa novostečenom rezistencijom nisu izložene tom antibiotiku, odnosno ako se on ne upotrebljava za liječenje infekcije koju ta bakterija uzrokuje, te bakterijske jedinice ostaju rijetke unutar osjetljive populacije bakterija. Međutim, pri korištenju tih antibiotika, bakterijski sojevi sa stečenom rezistencijom su u selektivnoj prednosti, preživljavaju i razmnožavaju se te s vremenom prevladaju u toj bakterijskoj populaciji.

Bakterije sa stečenom rezistencijom mogu prenositi gene rezistencije vertikalnim i horizontalnim prijenosom. Vertikalni prijenos gena je prijenos genetskog materijala sa roditelja na potomke razmnožavanjem. Bakterije se nespolno umnažaju binarnom diobom kojom nastaju genetički istovjetne jedinice, tj. klonovi. Horizontalni prijenos gena je izmjena genetskog materijala između DNA različitih jedinki, odnosno to je rekombinacija u bakterija. Transformacija, konjugacija i transdukcija tri su mehanizma rekombinacije u bakterija (Kalenić i sur. 2013)

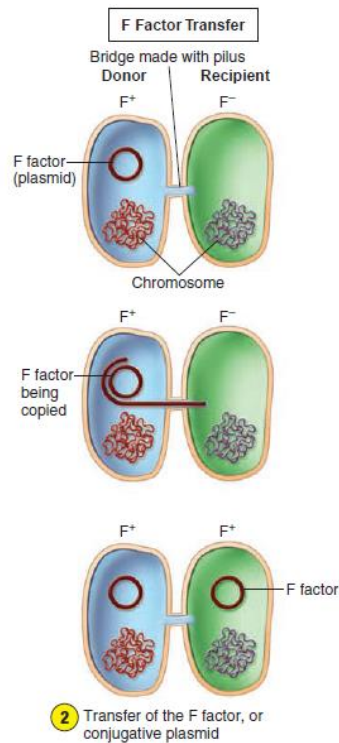
Transformacija je proces prijenosa i ugradnje većih fragmenta strane gole DNA iz okoliša u DNA stanice recipijenta (Sl. 1.). Stanice kompetentne za transformaciju na svojoj površini imaju proteine primatelje za koje se, uz utrošak energije, veže strana dvolančana DNA. U stanicu recipijenta ulazi samo jedan lanac dvolančane DNA te se homolognom rekombinacijom ugradi u genom recipijenta. U prirodnim se uvjetima u okolini živih bakterija jedne vrste uvijek nalaze i raspadnute bakterije iste vrste te fragmenti njihovih makromolekula kao što je DNA. Transformacija omogućuje bakterijama pribavljanje novih korisnih gena kao što su geni rezistencije na antibiotike. U prirodi transformaciju nalazimo kod vrsta *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Helicobacter pylori* (Kalenić i sur. 2013).



Slika 1. Koraci transformacije kod bakterije *Streptococcus pneumoniae*

Preuzeto iz Talaro i Chess 2012.

Konjugacija je prijenos genetičkog materijala iz stanice donora u stanicu primatelja preko spolnog pilusa (Sl. 2.). F-plazmid je plazmid koji nosi gene za stvaranje spolnog ili F-pilusa. Bakterijska stanica sa slobodnim F-plazmidom je donor ili F^+ stanica, a stanica bez F-plazmida je recipijent ili F^- stanica. Izlučivanjem male signalne molekule F^- stanica potiče ekspresiju gena na F-plazmidu u F^+ stanici čime nastaje F-pilus. F-pilus je šuplja cjevčica koja spaja citoplazme ovih dviju stanice te preko koje jedna kopija prethodno repliciranog F-plazmida prelazi iz F^+ u F^- stanicu. Prijenosom F-plazmida F^- stanica postaje F^+ te može konjugirati s drugim F^- stanicama. Na F-plazmidu mogu se nalaziti i drugi geni kao što su geni rezistencije na antibiotike te tada te plazmide zovemo R-plazmidi. Neki su plazmidi vrlo specifični pa se konjugacija odvija samo među tim vrstama bakterija, dok drugi imaju manju specifičnost i mogu se prenositi između bakterija različitih vrsta, rodova ili porodica (Kalenić i sur. 2013).

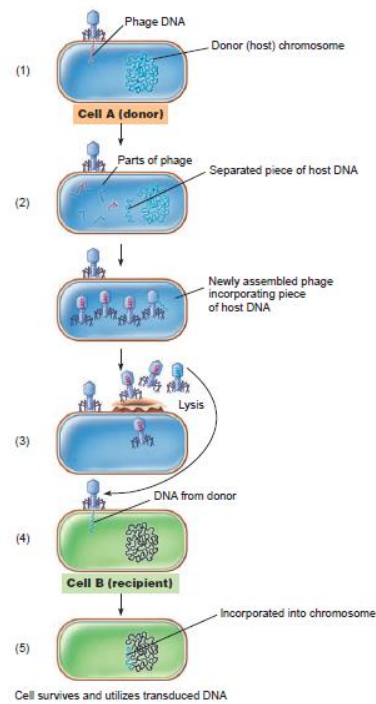


Slika 2. Prikaz koraka konjugacije

Preuzeto iz Talaro i Chess 2012.

Transdukcija je prijenos genetičkog materijala iz jedne bakterijske stanice u drugu pomoću bakteriofaga. Bakteriofag je virus koji inficira bakterije. Građen je od glave u kojoj se nalazi DNA te repa s repnim fibrilima pomoću kojih se specifično veže za bakterijsku stanicu. Prilikom infekcije u bakterijsku stanicu ulazi samo virusna DNA koja dovodi do razgradnje genetičkog materijala bakterija te kontrolira proizvodnju novih dijelova budućih bakteriofaga (Sl. 3.). U određenim slučajevima pri sastavljanju novih bakteriofaga umjesto DNA virusa u glavu bakteriofaga može se „zapakirati“ fragment DNA bakterije. Prilikom infekcije slijedeće bakterijske stanice taj se fragment DNA prenese i rekombinacijom ugradi u genom druge bakterije. Postoji i drugi način transdukcije koji uključuje bakteriofage sa lizogenim ciklusom. Tijekom lizogenog ciklusa bakteriofag ugradi svoju DNA u kromosom bakterije domaćina te se dalje pasivno replicira kao dio bakterijskog kromosoma. U nepovoljnim uvjetima DNA bakteriofaga se izrezuje iz kromosoma domaćina i ulazi u normalan ciklus replikacije i sastavljanja novih bakteriofaga što se još naziva i litički ciklus. Prilikom izrezivanja DNA virusa iz bakterijskog kromosoma može doći do greške – zahvati se i dio bakterijske DNA te dolazi do replikacije i sastavljanja novih bakteriofaga sa fragmentom bakterijske DNA. Infekcijom drugih stanica ta se DNA prenosi i može se

homolognom rekombinacijom ugraditi u genom druge bakterije. Transdukcija je visoko specifična zbog specifičnih receptora za bakteriofage na površini bakterijske stanice pa se odvija samo unutar određenog tipa određene bakterijske vrste (Kalenić i sur. 2013).



Slika 3. Koraci transdukcije
Preuzeto iz Talaro i Chess 2012.

4. BAKTERIJE S VIŠESTRUKOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE

Usporedno s pojavom i korištenjem prvih antibiotika javlja se i problem bakterijske rezistencije na njih. U prošlosti, problem rezistencije rješavao se uvođenjem novih antibiotika. U današnje je vrijeme sve manje novih antibiotika dok broj bakterija sa stečenom rezistencijom raste. Glavni pokretač razvoja rezistencije na antibiotike je prekomjerna i neracionalna uporaba antibiotika u medicini i veterini. Zloupotreba antibiotika čest je problem diljem svijeta, a obuhvaća korištenje antibiotika kada nisu potrebni, ne pridržavanje prepisanih doza, samoliječenje antibioticima te drugo. Prekomjerna i nepotrebna uporaba antibiotika predstavlja selekcijski pritisak na bakterijsku populaciju, potiče njihovu prilagodbu te posljedično dolazi do razvoja rezistencije. Horizontalnim prijenosom rezistentne bakterije mogu prenositi tu rezistenciju na druge bakterije čime se povećava broj bakterija rezistentnih na određeni antibiotik. Bakterije s višestrukom rezistencijom predstavljaju globalnu prijetnju ljudskom zdravlju. Suženi izbor antibiotika koji se mogu koristiti za liječenje infekcija uzrokovanim ovim bakterijama dovodi do produljenja bolničkog liječenja te je smrtnost veća u usporedbi s infekcijama uzrokovanim konvencionalnim bakterijama. Problem bakterija s višestrukom rezistencijom najizraženiji je u bolnicama, posebice na kirurškim odjelima i odjelima za intenzivnu njegu gdje je upotreba antibiotika različitih klasa najveća te su pacijenti izrazito podložni infekcijama (Volar 2017).

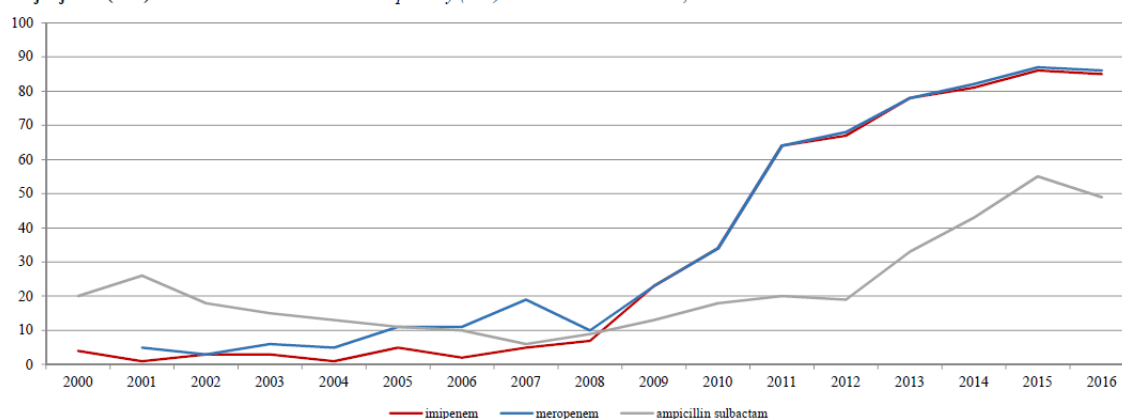
Na europskoj razini, sustavno praćenje bakterijske rezistencije na antibiotike počelo je 1999. godine u okviru *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) projekta. EARSS je 2010. godine prerastao u kontinuirani program EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti u kojem Hrvatska sudjeluje od samog početka. Iako postoje mnoge patogene bakterije s rezistencijom na antibiotike, u sklopu EARS-Net-a prioritetno se prati rezistencija osam bakterijskih vrsta: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* (Akademija medicinskih znanosti Hrvatske 2017).

Acinetobacter baumannii jedan je od vodećih bolničkih patogena. To je Gram negativan, nefermentativan, nepokretan, aeroban kokobacil. Otporan je na različite okolišne uvjete te može stvoriti biofilm. Većinom uzrokuje bolničke infekcije te je posebno problematičan u odjelima za intenzivnu njegu, no zabilježen je i kao povremen uzročnik infekcija dobivenih izvan bolnica. Uzročnik je raznih infekcija kao što su: upala pluća, infekcije kože i mekanog tkiva, sekundarni meningitis, infekcije urinarnog trakta,

endokarditis. *A. baumannii* je urođeno rezistentan na mnoge antibiotike te lako i brzo stječe rezistenciju na preostale antibiotike. Urođeno je rezistentan na ampicilin, amoksisicilin-klavulansku kiselinu, cefazolin, cefaleksin, cefotaksim, ceftriakson, aztreonam, ertapenem, trimetoprim, fosfomicin i tetracikline (EUCAST 2016). Prije su se infekcije uzrokovane ovom bakterijom uspješno liječile karbapenemima, no od 2008. godine rezistencija *A. baumannii* na karbapeneme se naglo proširila što otežava liječenje (Sl. 4.). Prema zadnjim podacima iz 2016. godine stope neosjetljivosti na karbapeneme su i dalje visoke te iznose 85% za imipenem i 86% za meropenem. Neosjetljivost na ampicilin/sulbaktam također je u visokim vrijednostima te je iznosila 49% u 2016. Osjetljivost na kolistin se zasada određuje samo kod acinetobaktera rezistentnih na karbapeneme, no već su zabilježeni izolati *A.baumannii* rezistentni i na kolistin (Akademija medicinskih znanosti Hrvatske 2017).

Acinetobacter baumannii

neosjetljivost (R+I) na antibiotike u RH / non-susceptibility (R+I) to antibiotics in Croatia, 2000. - 2016.



Slika 4. Prikaz stope neosjetljivosti *Acinetobacter baumannii* na antibiotike u Hrvatskoj, 2000. – 2016.g.

Preuzeto iz Akademija medicinskih znanosti Hrvatske 2017

5. NALAZI BAKTERIJA SA STEČENOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE U OTPADNIM VODAMA

Uz kontinuirano praćenje bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike u bolničkim okruženjima, u posljednje se vrijeme postavlja pitanje širenja tih bakterija iz bolnica u okoliš. Širenje bakterija iz bolnica u okoliš prati se analizama otpadnih voda. Prioritetno se prati širenje bakterija s višestrukom rezistencijom koje uzrokuju bolničke infekcije, a na vrhu te liste je već prethodno spomenuti *A. baumannii*. U vodi rijeke Siene (Girlich i sur. 2010) pronađen je prvi okolišni izolat *A. baumannii* s višestrukom rezistencijom na antibiotike te je dokazana njegova veza s bolničkim izolatom. U Brazilu (Ferreira i sur. 2011) su iz netretiranih bolničkih otpadnih voda izolirana tri izolata *A. baumannii* s višestrukom rezistencijom. Iz netretiranih bolničkih otpadnih voda u Kini (Zhang i sur. 2013) su također izolirani izolati ove bakterije sa stečenom rezistencijom.

U Hrvatskoj je 2014. godine provedeno prvo istraživanje (Hrenović i sur. 2016) koje je dokazalo prisustvo *A. baumannii* sa stečenom rezistencijom na karbapeneme u otpadnim vodama grada Zagreba te vezu pronađenih izolata s bolničkim izolatima. Analizirana otpadna voda sakupljena je u Komunalnom postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. U to postrojenje dolazi otpadna voda iz domaćinstava, bolnica, industrijska otpadna voda te oborinska voda. Prema nacionalnom zakonodavstvu, sanitarne bolničke otpadne vode su puštene u sistem kanalizacije bez prethodnog tretmana; samo se radioaktivne otpadne vode i infektivan kruti otpad odlažu zasebno. Zagrebačko komunalno postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda dizajnirano je za sekundarni tretman otpadnih voda. Nakon primarnog tretmana, otpadne vode odlaze u bazene za aeraciju s aktivnim muljem. Zatim višak mulja odlazi na razgradnju anaerobnim mezofilnim bakterijama. Taj je višak mulja koncentrat različitih mikroorganizama, uključujući i one patogene. Konačno, nakon razgradnje, iz mulja se uklanja voda te mu se povisi pH tretmanom vapnom. Nedezinficirana otpadna voda se otpušta u svoj konačni recipijent - rijeku Savu. U istraživanju iz 2014. godine svi izolati *A. baumannii* iz otpadnih voda pokazali su rezistenciju na karbapeneme te općenitu višestruku rezistenciju na antibiotike (Tab. 1.).

U otpadnim vodama koje utječu u komunalno postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda, bakterije s rezistencijom na karbapeneme činile su 34 - 57% , ovisno o uzorku, ukupne količine heterotrofnih bakterija. U otpadnim vodama koje otječu iz postrojenja u rijeku Savu te su bakterije činile 22 - 29% ukupnih heterotrofnih bakterija. Velika zastupljenost *A. baumannii* rezistentnih na karbapeneme u otpadnim vodama upućuje na njihovo bolničko

porijeklo. Dodatna potvrda bolničkog porijekla *A. baumannii* sa stečenom rezistencijom na karbapeneme u otpadnim vodama su slične stope rezistencije izolata iz otpadnih voda s onima izoliranima iz bolnica (Hrenović i sur. 2016).

Tablica 1. Minimalne inhibitorne koncentracije testiranih antibiotika i osjetljivost izolata *A. baumannii* na njih
Preuzeto iz Hrenović i sur. 2016.

Isolate	Minimum inhibition concentration values of antibiotics (mg/L)									<i>bla</i> _{OXA-10-like}
	MEM	IPM	LVX	CIP	TOB	GEN	AMK	SXT	CST	
IN4	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	>16 ^R	8 ^R	4	20	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
IN5	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	>16 ^R	>16 ^R	4	20	0.25	Not tested
IN6	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	16 ^R	2	>16 ^R	8	10	0.19	Not tested
IN8	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	8 ^R	2	>16 ^R	8	10	0.25	— ^a
IN9	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	16 ^R	8 ^R	2	2	20	0.25	<i>bla</i> _{OXA-40-like}
IN10	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	8 ^R	>16 ^R	>16 ^R	2	16	0.25	<i>bla</i> _{OXA-40-like}
IN11	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	8 ^R	>16 ^R	>16 ^R	2	16	0.25	Not tested
IN12	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	8 ^R	>16 ^R	4	16	0.50	<i>bla</i> _{OXA-40-like}
IN13	>32 ^R	>32 ^R	>8 ^R	8 ^R	4 ^R	>16 ^R	4	20	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
IN14	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	16 ^R	>16 ^R	8	16	0.75	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
IN15	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	2	>16 ^R	4	20	0.50	Not tested
IN16	>16 ^R	>16 ^R	4 ^R	16 ^R	4 ^R	4 ^R	4	20	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
IN17	32 ^R	>32 ^R	>8 ^R	16 ^R	16 ^R	>16 ^R	8	16	0.50	Not tested
IN18	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	8 ^R	8 ^R	>16 ^R	4	20	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
IN19	>16 ^R	>16 ^R	4 ^R	4 ^R	8 ^R	8 ^R	16 ^R	16	0.50	Not tested
EF1	>16 ^R	>16 ^R	4 ^R	4 ^R	>16 ^R	>16 ^R	4	20	0.50	Not tested
EF2	>16 ^R	>16 ^R	4 ^R	8 ^R	8 ^R	8 ^R	4	20	0.25	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
EF3	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	4 ^R	>16 ^R	4	20	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
EF4	>32 ^R	>32 ^R	>8 ^R	4 ^R	>16 ^R	>16 ^R	16 ^R	32	0.75	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
EF5	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	>16 ^R	>16 ^R	32 ^R	32	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}
EF6	>16 ^R	>16 ^R	>8 ^R	4 ^R	>16 ^R	>16 ^R	64 ^R	32	0.50	<i>bla</i> _{OXA-23-like}

AMK: amikacin; CIP: ciprofloxacin; CST: colistin; GEN: gentamicin; IPM: imipenem; LVX: levofloxacin; MEM: meropenem; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole; TOB: tobramycin; R: resistant according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing criteria.

^a The constitutive gene *bla*_{OXA-15-like} was confirmed in all isolates.

^b No acquired *bla*_{OXA-like} gene.

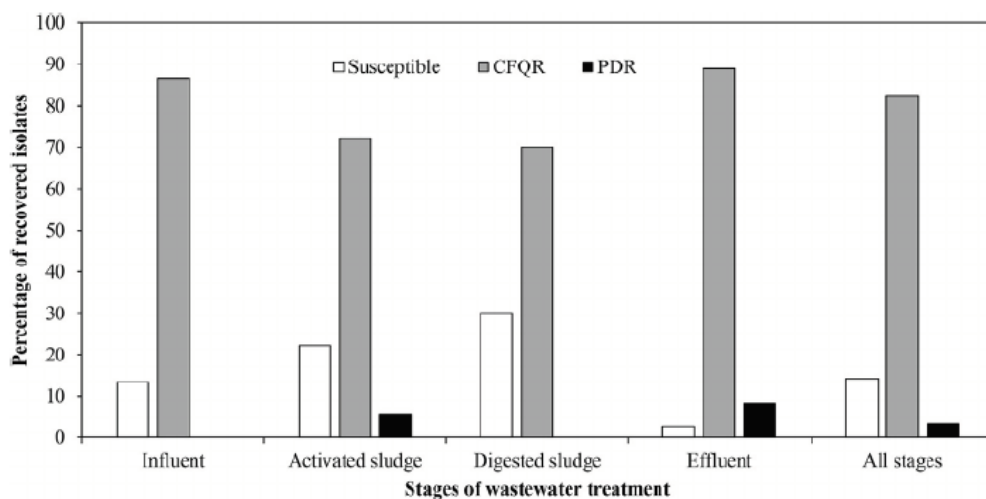
IN – izolati *A. baumannii* iz otpadnih voda koje utječu u komunalno postrojenje za pročišćavanje voda;

EF – izolati *A. baumannii* iz otjecajnih otpadnih voda; nazivi antibiotika su napisani ispod tablice

Podrobnijim istraživanjem otpadnih voda grada Zagreba tijekom perioda od dva mjeseca 2015. godine dobiveni su jasniji dokazi o širenju *A. baumannii* s višestrukom rezistencijom iz bolnica u okoliš putem otpadnih voda (Šeruga Musić i sur. 2017). Uspoređivali su se izolati *A. baumannii* izolirani iz pacijenata u bolnicama s izolatima ove bakterije iz netretiranih bolničkih otpadnih voda, iz uzoraka otpadnih voda uzetih iz komunalnog postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda te iz površinske vode rijeke Save kao finalnog recipijenta svih otpadnih voda. Genetičkim analizama te uspoređivanjem stopa rezistencije na antibiotike dokazana je veza između bolničkih izolata *A. baumannii* i *A.*

baumannii pronađenima u otpadnim vodama i rijeci Savi. Svi su izolati, bolnički i okolišni, pokazali višestruku rezistenciju na antibiotike (Šeruga Musić i sur. 2017).

Kako bi se dobila cjelokupna slika o prisutnosti i širenju bolničke bakterije *A. baumannii* s višestrukom rezistencijom na antibiotike u otpadnim vodama, provedeno je istraživanje u kojem se godinu dana pratila prisutnost ove bakterije u različitim fazama tretmana otpadnih voda (Higgins i sur. 2018). Uzorci su uzimani iz komunalnog postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba i to iz pet faza sekundarnog tretmana: otpadne vode koja utječe u postrojenje, otpadne vode koja otječe iz postrojenja, aktivnog mulja, mulja nakon razgradnje anaerobnim mezofilnim bakterijama te iz stabiliziranog mulja. Jedino u stabiliziranom mulju nije pronađen *A. baumannii*. 86% svih izolata ove bakterije pokazalo je rezistenciju na većinu testiranih antibiotika, dok je ostatak bio osjetljiv na sve testirane antibiotike. Većina izolata pokazala je rezistenciju na karbapeneme i fluorokinolone, dok je manji broj izolata pokazao rezistenciju i na kolistin (Sl. 5.). Prisustvo *A. baumannii* u aktivnom i digestiranom mulju te u otpadnim vodama koje odlaze u rijeku Savu navodi da dio ovih bakterija zaostaje u aktiviranom mulju, a dio odlazi zajedno s otpadnom vodom iz postrojenja u Savu. Dodatnim istraživanjima je potvrđeno preživljavanje ove bakterije tijekom procesa digestije aktivnog mulja anaerobnim mezofilnim bakterijama. To sve navodi da je anaeroban okoliš kao ekološka niša važan u preživljavanju i epidemiologiji ovog patogena. S druge strane, prisutnost izolata osjetljivih na antibiotike asocira kanalizaciju i otpadne vode kao sekundarno stanište ove bakterije izvan bolnica. Prisutnost *A. baumannii* sa stečenom rezistencijom u tretiranim otpadnim vodama i rijeci Savi (Šeruga Musić i sur. 2017, Higgins i sur. 2018) te dokaz o sposobnosti preživljavanja ove bakterije u otpadnoj vodi (Hrenović i sur. 2016) upućuju na opasnost širenja ovog patogena dalje u okoliš preko prirodnih voda. Iako je ovim istraživanjem klasična dezinfekcija viška mulja vapnom dokazana kao učinkovita metoda uništavanja ove bakterije u mulju, potrebne su nove metode dezinfekcije otpadnih voda koje odlaze u prirodne vode kako bi se spriječilo širenje ovog patogena u okoliš.



Slika 5. Osjetljivost izolata *A.baumannii* izoliranih iz različitih faza tretmana otpadnih voda na antibiotike

Preuzeto iz Higgins i sur. 2018.

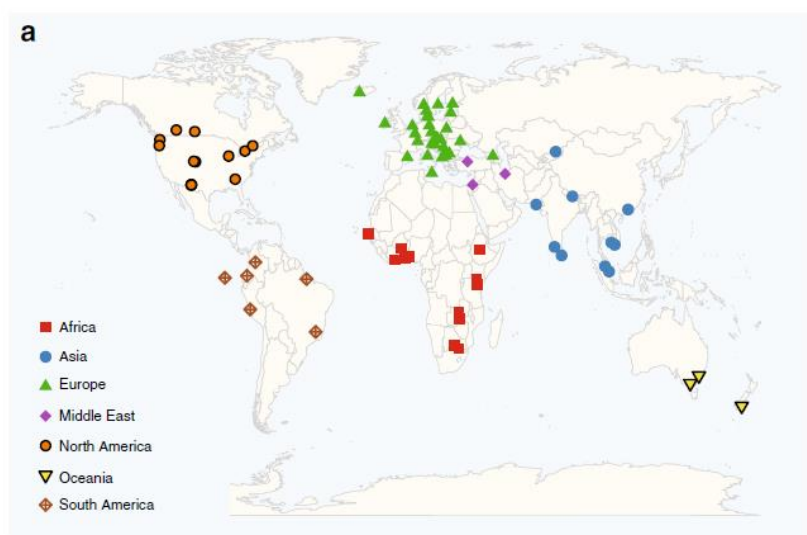
CFQR – rezistencija na karbapeneme i fluorokinone; PDR – rezistencija na karbapeneme, fluorokinone i kolistin

6. OTPADNE VODE KAO MEDIJ ZA PRAĆENJE BAKTERIJA SA STEČENOM REZISTENCIJOM NA ANTIBIOTIKE U ZDRAVOJ POPULACIJI

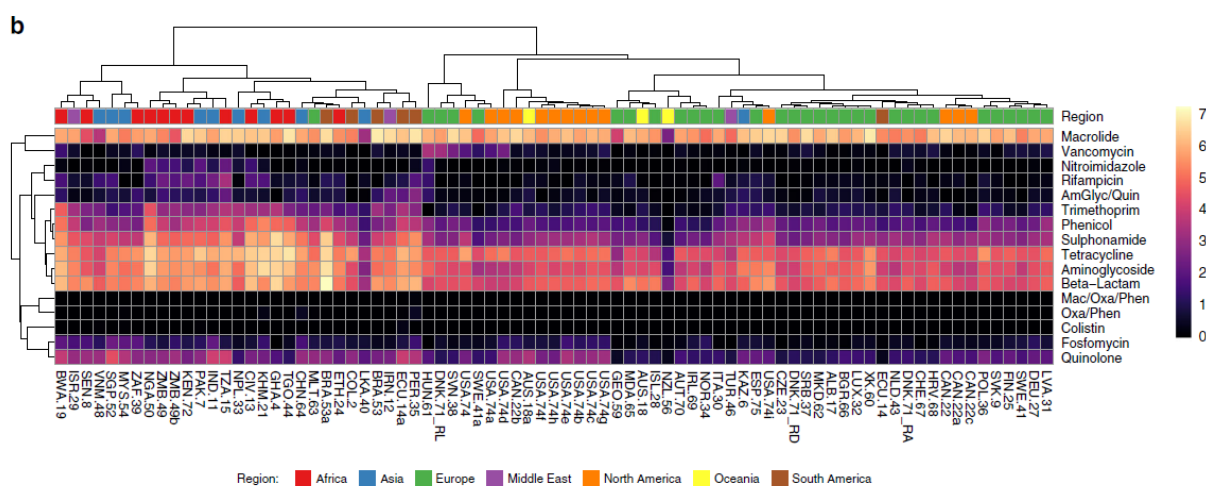
Kontinuirano praćenje i pouzdani podaci o broju i raznolikosti bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike u cjelokupnoj populaciji nužni su za rješavanje ovog problema na globalnoj razini. Dosada, većina istraživanja bakterija sa stečenom rezistencijom koncentrirala su se na analize rezistencije određenih patogena izoliranih iz pacijenata u bolnicama. Podaci dobiveni tim istraživanjima često su međusobno neusporedivi te daju suženu sliku bakterijske rezistencije. Kako bi se dobila prava slika problema bakterijske rezistencije na antibiotike potrebno je pratiti i analizirati rezistentne bakterije pronađene u cjelokupnoj populaciji koja je dominantno zdrava. Otpadne vode gradova prepoznate su kao dobar medij za praćenje bakterija sa stečenom rezistencijom u zdravoj populaciji. Prednosti urbanih voda kao medija za istraživanje bakterijske rezistencije na antibiotike su: jednostavnost, mali ekonomski troškovi, činjenica da uzimanje uzorka ne zahtjeva informirani pristanak građana te dobivanje podataka o cjelokupnoj, dominantno zdravoj, populaciji. Prijašnja su se istraživanja bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike u otpadnim vodama koncentrirala samo na praćenje širenja određenih patogena iz bolnica u okoliš.

Prvi pokušaj globalnog praćenja rezistencije bakterija na antibiotike u dominantno zdravim populacijama opisan je u znanstvenom radu (Hendriksen i sur. 2019) objavljenom 2019. godine. U ovom istraživanju analizirani su uzorci otpadnih voda uzetih sa 79 lokacija u 74 gradova u 60 država (Sl. 6.). Metagenomskom analizom uzoraka dobiveni su podaci o genima bakterijske rezistencije na antibiotike. Uspoređujući podatke dobivene iz različitih lokacija uočene su razlike u ukupnoj količini i raznolikosti gena bakterijske rezistencije. Najveće količine gena rezistencije uočene su u afričkim zemljama, no od svih zemalja najveću količinu gena rezistencije imao je Brazil. Najmanje količine gena rezistencije na antibiotike imala je Oceanija kojoj pripadaju Australija i Novi Zeland. Iz uzoraka je ukupno identificirano 1625 različitih gena rezistencije na antibiotike koji pripadaju 408 grupa gena. Najviše identificiranih gena kodira za rezistenciju na makrolide, tetracikline, aminoglikozide, betalaktame i sulfonamide. Prema razlikama u količini i raznolikosti pronađenih gena rezistencije na antibiotike može se napraviti podjela svijeta na dvije grupe – Europa/Sjeverna Amerika/Oceanija i Afrika/Azija/Južna Amerika. U uzorcima grupe Europa/Sjeverna Amerika/Oceanija pronađen je velik broj točno određenih gena rezistencije na makrolide, dok su uzorci iz Afrike/Azije/Južne Amerike sadržavali velik broj različitih gena rezistencije iz različitih grupa gena (Sl. 7.). Uzorci iz Afrike/Azije/Južne Amerike pokazali su rezistenciju

na tetracikline, aminoglikozide, betalaktame, sulfonamide i trimetoprim. Uzorci iz Vijetnama, Indije i Brazila pokazali su najveću raznolikost gena rezistencije na antibiotike što navodi na pretpostavku da su ove zemlje vruće točke za pojavu novih mehanizama rezistencije na antibiotike.



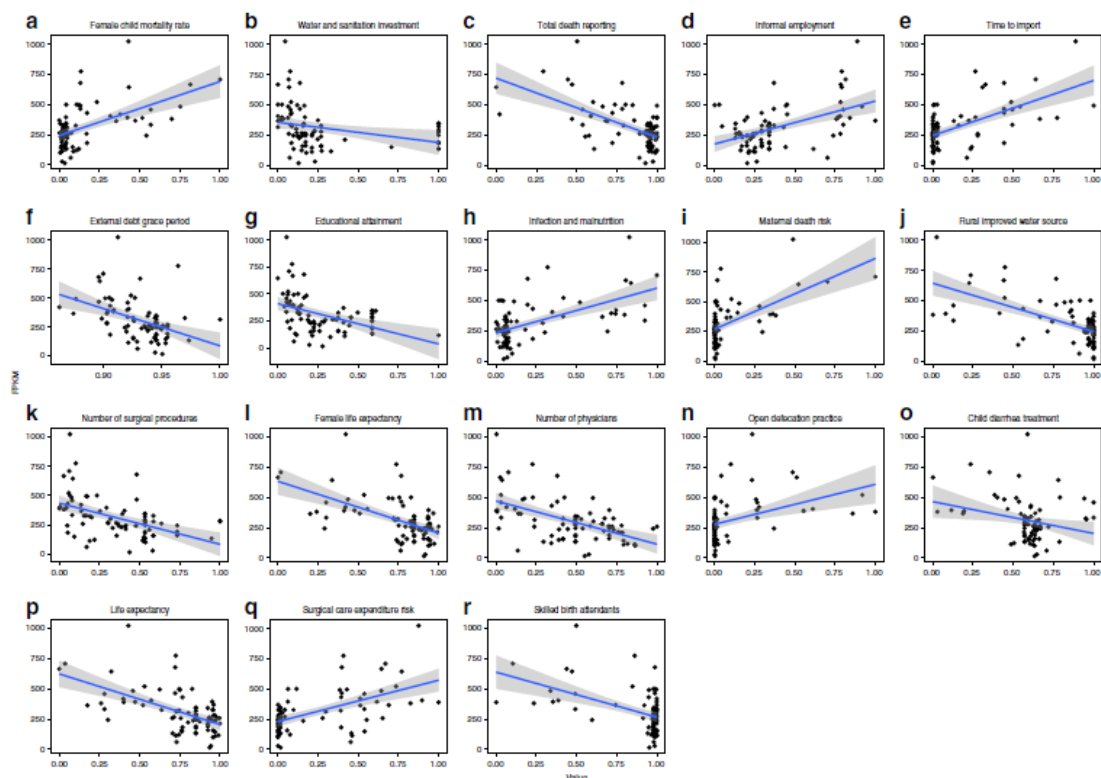
Slika 6. Karta mjesta iz kojih su uzimani uzorci otpadnih voda
Preuzeto iz Hendriksen i sur. 2019.



Slika 7. Heat map rezistencije uzoraka na antibiotike
Preuzeto iz Hendriksen i sur. 2019.

relativna količina gena rezistencije (FPKM – fragments per kilo base per million fragments) pridružena je klasama antibiotika

Testiranjem povezanosti količine korištenih antibiotika s brojem i raznolikošću gena rezistencije u pojedinim regijama uočeno je da je uzimanje antibiotika određene klase povezano s količinom gena koji kodiraju za rezistenciju na tu određenu klasu antibiotika. Međutim, ukupna količina korištenih antibiotika nema značajan efekt na cjelokupan broj različitih gena rezistencije na antibiotike. S druge strane, uočena je veza između razvijenosti pojedine zemlje i ukupnog broja gena rezistencije pronađenog u njoj. Broj pronađenih gena rezistencije korelira s različitim varijablama specifičnim za pojedinu zemlju i to prvenstveno s varijablama vezanima uz provođenje zdravstvenih mjera te cjelokupno zdravlje ljudi u zemlji (Sl. 8.). To navodi na zaključak da količina korištenih antibiotika objašnjava samo dio pojave bakterijske rezistencije u svijetu, a da velik utjecaj na ukupnu količinu bakterijskih gena rezistencije na antibiotike imaju lokalni/nacionalni parametri vezani uz zdravlje i zdravstvene mjere.



Slika 8. Prikaz korelacije ukupnog broja gena rezistencije na antibiotike s različitim varijablama specifičnima za pojedinu zemlju

Preuzeto iz Hendriksen i sur. 2019.

7. ZAKLJUČAK

Horizontalnim prijenosom gena bakterije svakodnevno stječu rezistenciju na različite antibiotike. Veliku opasnost predstavljaju patogene bakterije s višestrukom rezistencijom na antibiotike, a neracionalnim korištenjem antibiotika takvih je bakterija sve više. Broj pacijenata koji umiru od infekcija dobivenih u bolnicama svakodnevno raste, a najčešći uzročnik tih infekcija su upravo bakterije koje su stekle rezistenciju na različite klase antibiotika kao što je *Acinetobacter baumannii*. Osim što se javljaju u bolnicama gdje uzrokuju bolničke infekcije, dokazano je da takve bakterije mogu dospjeti u otpadne vode koje im postaju sekundarno stanište te medij za daljnje širenje u okoliš. Širenje patogenih bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike u okoliš predstavlja veliku opasnost za ljudsko zdravlje zbog čega je potrebno uvesti nove metode pročišćavanja otpadnih voda koje će uništiti ove bakterije prije nego što dospiju u prirodan okoliš. Klasična dezinfekcija vapnom pokazala se kao učinkovita metoda uništavanja ovih bakterija u mulju dobivenom sekundarnim tretmanom otpadnih voda.

Rješavanje problema rezistencije bakterija na antibiotike na globalnoj razini zahtjeva praćenje rezistentnih bakterija u cjelokupnoj, dominantno zdravoj populaciji. Otpadne vode su dobar medij za praćenje rezistentnih bakterija radi jednostavnosti sakupljanja uzoraka, malog ekonomskog troška te etičkih razloga. Podaci o broju i raznolikosti rezistentnih bakterija u otpadnim vodama diljem svijeta međusobno su usporedivi te daju sliku rezistencije na antibiotike u cijeloj populaciji. Prvim takvim globalnim praćenjem rezistencije na antibiotike uočene su razlike u brojnosti i raznolikosti rezistentnih bakterija između različitih regija svijeta. Analize su pokazale da su te razlike vezane uz varijable specifične za pojedinu zemlju i prvenstveno se odnose na zdravstvo i zdravstvene mjere. To upućuje na zaključak da se poboljšanjem zdravstva, sanitacije i, potencijalno, edukacijom može efektivno djelovati na smanjenje globalnog problema rezistencije bakterija na antibiotike.

8. LITERATURA:

- Abram, M., Škrobonja, I., Ambrožić, D., Repac-Antić, D., i Bubonja Šonje, M. (2018). ESKAPE–bakterije koje su uzbunile svijet. *Medicina Fluminensis*, 54(3), 242-253.
- Akademija medicinskih znanosti Hrvatske (2017). Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2016. g., Zagreb.
- Duvančić, T. (2019). Mehanizmi rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2016). EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes. Expert Rules Version 3.1.
- Ferreira, A. E., Marchetti, D. P., De Oliveira, L. M., Gusatti, C. S., Fuentefria, D. B., i Corcao, G. (2011). Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 221-227.
- Girlich, D., Poirel, L., i Nordmann, P. (2010). First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 578-579.
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenka, O., i sur. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1), 1124.
- Higgins, P.G., Hrenović, J., Seifert, H., i Dekić, S. (2018). Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research*, 140, 261-267.
- Hrenović, J., Goić-Barišić, I., Kazazić, S., Kovačić, A., Ganjto, M., i Tonkić, M. (2016). Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance*, 21(15), 21-30.
- Kalenić, S., i sur. (2013). *Medicinska mikrobiologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Šeruga Musić, M., Hrenović, J., Goić-Barišić, I., Hunjak, B., Škorić, D., i Ivanković, T. (2017). Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *Journal of Hospital Infection*, 96(4), 323-327.

- Talaro, K. P. i Chess, B. (2012). *Foundations in Microbiology*, 8th edition. McGraw Hill, New York.
- Volar, M. (2017). Prekomjerna upotreba antibiotika i problemi rezistencije: stavovi i mišljenja pacijenata. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Zhang, C., Qiu, S., Wang, Y., Qi, L., Hao, R., Liu, X., i Li, P. (2013). Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PloS one*, 8(6), e64857.

9. SAŽETAK

Bakterije mogu biti prirodno otporne na antibiotike ili steći rezistenciju na njih mutacijom u genomu ili horizontalnim prijenosom gena. Sve je više bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike što otežava liječenje infekcija uzrokovane njima. Najveći problem izazivaju bakterije s višestrukom rezistencijom na antibiotike koje uzrokuju bolničke infekcije. Dokazano je da se takve bakterije mogu proširiti iz bolnica u okoliš putem otpadnih voda. Nužne su efikasne metode pročišćavanja i dezinfekcije otpadnih voda kako bi se spriječilo širenje patogenih bakterija višestruko rezistentnih na antibiotike u okoliš. Kontinuirano i pouzdano praćenje bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike prvi je korak u rješavanju ovog globalnog problema. Otpadne vode gradova su dobar medij za praćenje bakterija sa stečenom rezistencijom na antibiotike u zdravoj populaciji zbog jednostavnosti uzimanja uzorka, etičkih razloga i niskih troškova. Analizama otpadnih voda uočene su razlike u brojnosti i raznolikosti rezistentnih bakterija između pojedinih dijelova svijeta. Te su razlike primarno povezane sa zdravstvenim mjerama i razvijenosti pojedinih zemlja što navodi na zaključak da bi se poboljšanjem zdravstva i sanitacije moglo učinkovito djelovati na smanjenje problema bakterijske rezistencije na antibiotike.

10. SUMMARY

Bacterial antibiotic resistance can be either intrinsic, or bacteria can become acquired resistant as the result of mutation or horizontal gene transfer. The number of bacteria with acquired resistance to antibiotics is increasing which makes disease treatment more difficult. The biggest problem cause multidrug-resistant bacteria that cause nosocomial infections. It is proven that such bacteria can spread from hospitals to the natural environment via the sewage. Proper disinfection of wastewater is needed to prevent emission of pathogenic multidrug-resistant bacteria to the natural environment. The first step in solving this global problem is continuous and reliable monitoring of bacteria with acquired resistance to antibiotics. Urban wastewater is found to be a good medium for monitoring bacteria with acquired resistance in a healthy population due to ethical reasons and because taking samples is fairly easy and affordable. Differences in abundance and diversity of resistant bacteria between certain parts of the world were found after analyzing wastewater samples. The differences are primarily connected to the country's development and health measures that leads to a conclusion that the problem of antibiotic resistance can be reduced by improving healthcare and sanitation.