# Rezistencija na antibiotike u okolišnih izolata bakterije Klebsiella pneumoniae

**Eržen, Monika**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:272871

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

# Rezistencija na antibiotike u okolišnih izolata bakterije *Klebsiella pneumoniae*

# Antibiotic resistance in environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Seminarski rad

Monika Eržen,

3. godina, Znanosti o okolišu,

Preddiplomski studij

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, rujan 2019. godine

**1. Uvod**

1.1. Opće karakteristike bakterije *Klebsiella pneumoniae*……3

1.2. Patogenost bakterije *Klebsiella pneumoniae*……..4

**2. Rezistencija na antibiotike**

2.1. Antibiotici……...5

2.2. Rezistencija……6

2.3. Rezistencija bakterije *Klebsiella pneumoniae*……6

2.3.1. Karbapenemi……7

2.3.2. Antibiotik kolistin……10

**3. Okolišni izolati bakterije *Klebsiella pneumoniae* i njihova rezistencija**

3.1. Uvod……12

3.2. Istraživanje 2014./2015. godine u području Oltrepò Pavese……...13

3.2.1. Identifikacija bakterija……....15

3.2.2. Rezultati istraživanja…….……16

3.2.3. Geni otpornosti……...18

**4. Preživljavanje bakterije *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima vode**

4.1. Istraživanje…….……20

4.2. Rezultati istraživanja……20

**5. Zaključak**……21

**6. Literatura**……...23

**7. Sažetak**……....25

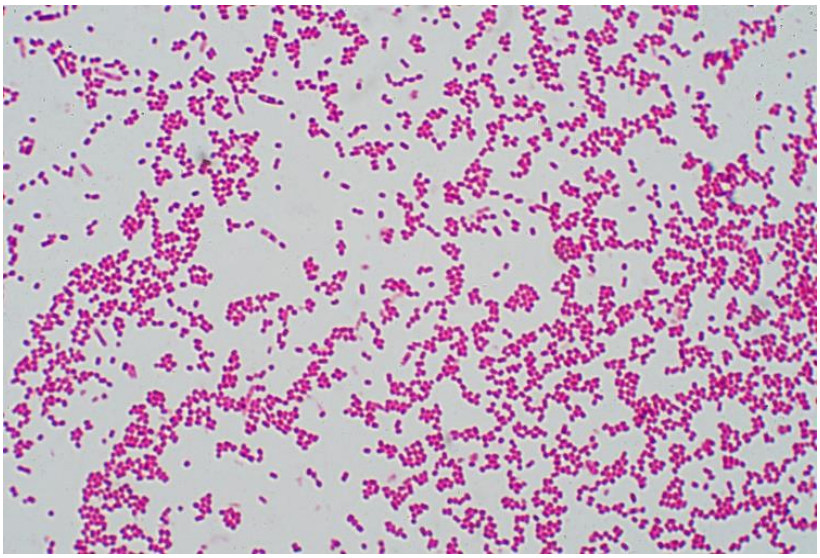
**8. Summary**……....25

# 1. Uvod

## 1.1. Opće karakteristike bakterije *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* nepokretna je i gram-negativna štapićasta bakterija (**Slika 1.**), bacil iz porodice crijevnih bakterija ili *Enterobacteriaceae*. Otkrivena je 1882. godine zahvaljujući njemačkom patologu i mikrobiologu Carlu Friedländeru koji je sudjelovao u otkriću bakterijskog uzročnika upale pluća ili pneumonije. Međutim, bakterija je dobila ime po Edwinu Klebsu, njemačko-švicarskom patologu koji je prvi uočio prisutnost bakterija u dišnim putovima osoba umrlih od upale pluća (Duvančić 2019.).

Fakultativno je anaerobni organizam, odnosno može rasti u uvjetima s kisikom, ali i bez njega te posjeduje respiracijski i fermentacijski tip metabolizma. Kemoorganotrofni je organizam. Energiju dobiva oksidacijsko-redukcijskim reakcijama, a donor je elektrona organski spoj. *K. pneumoniae* je oksidaza-negativna i katalaza-pozitivna. Glukoza i laktoza su fermentirane uz proizvodnju kiseline i plina, ali pojavljuju se i sojevi koji ne stvaraju plinove ili ih proizvode u vrlo maloj koncentraciji. Primjerice, većina sojeva proizvodi 2,3-butandiol kao krajnji produkt fermentacije glukoze. Iako ne stvara endospore ni mikrociste, dobro preživljava u nepovoljnim okolišnim uvjetima. Nepokretna je bakterija, okružena polisaharidnom kapsulom što ju razlikuje od ostalih rodova porodice *Enterobacteriaceae*. Kapsula - sluzava opna štiti stanicu od nepovoljnih okolišnih čimbenika te joj omogućuje kolonizaciju abiotskih i biotskih površina (Brenner i sur. 2015).



**Slika 1.** Stanice bakterije *K. pneumoniae* nakon bojanja po Gramu (izvor: prof. Hrenović, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za mikrobiologiju)

Inkubacija kulture bakterije *K. pneumoniae* u laboratoriju provodi se u temperaturnom rangu od 35°C do 45°C. Sojevi bakterije rastu na svim vrstama medija koji se koriste za izolaciju i uzgoj enterobakterija kao što su hranjivi agar, Endo agar, Drigalski agar, Mac Conkey agar, EBM agar, BTB agar i dr. (Brenner i sur. 2015.). Staništa *K. pneumoniae* dijele se na klinička i okolišna kao što su slane i slatke vode, sedimenti, tla te vegetacija. Ne pripada skupini halofilnih bakterija, stoga ne može obitavati u područjima s visokom koncentracijom soli (Štimac i sur. 2009).

## 1.2. Patogenost bakterije *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* sveprisutna je bakterija te se smatra patogenom koji uzrokuje velik broj humanih, ali i životinjskih upala (**Slika 2.**). Sposobnost bakterije da uzrokuje bolest, odnosno njena virulencija ovisi o nekoliko čimbenika. Debela je polisaharidna kapsula najvažniji faktor budući da je njome zaštićena od procesa fagocitoze, odnosno od obrambenih mehanizama domaćina. Lipopolisaharidi, koji oblažu vanjsku površinu bakterije, također su jedan od značajnijih čimbenika, a neki od preostalih faktora obuhvaćaju i fimbrije, ravne i čvrste tvorbe koje omogućuju prihvaćanje za stanicu domaćina te siderofore, molekule koje uzimaju željezo od domaćina te omogućuju širenje upale (Duvančić 2019.).

U čovjeka se nalazi se u sluznici nosa, ustima te gastrointestinalnom traktu. Može se ponašati i kao oportunistički patogen, stoga je prisutna i u urinu, grlu, oku i na koži. Od 5 do 38% opće populacije nosi bakteriju u stolici, a od 1 do 6% u nazofarinsku, gornjem dijelu ždrijela. Izaziva razne bolničke infekcije kao što su urinarne, respiratorne infekcije te bakterijemije i izvanbolničke infekcije poput pneumonije i infekcije mokraćnog sustava. Veće stope kolonizacije bakterije javljaju se u ljudi porijeklom iz Kine, u kroničnih alkoholičara, osoba sa slabijim imunosnim sustavom te hospitaliziranih pacijenata. Najviše štete pridonosi djeci do prve godine života, ali i ljudima iznad pedeset godina života jer se tada najčešće javljaju problemi s urinarnim kanalima. Ukoliko se upale ne liječe, stopa smrtnosti je visoka (Duvančić 2019).

**Slika 2.** Kolonije bakterije *K. pneumoniae* porasle na Mac Conkey agaru (izvor: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/klebsiella%20pneumoniae%20photos/KLPN21.html)

# 2. Rezistencija na antibiotike

## 2.1. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koji sprječavaju rast bakterija i primjenjuju se za liječenje bakterijskih infekcija, dok na viruse i većinu gljivica nemaju nikakav učinak. Prilikom primjene ne nanose štetu organizmu domaćinu. Djelomično su prirodni proizvodi gljiva ili nekih bakterija, a dijelom su sintetički lijekovi. Otkriveni su 1928. godine zahvaljujući Alexanderu Flemingu, škotskom biologu. Naime, Fleming je otkrio da plijesan *Penicillium notatum* uništava bakterijske kolonije te je ubrzo pronašao način izolacije aktivne tvari koja se naziva penicilin (Duvančić 2019).

Antibiotici se prema djelovanju dijele na baktericidne koji uništavaju bakterijske stanice te bakteriostatske antibiotike čija je zadaća zaustavljanje rasta i razvoja bakterija. S obzirom na širinu djelovanja razlikuju se antibiotici sa širokim spektrom djelovanja te oni s užim spektrom djelovanja. Učestalim i nepotrebnim uzimanjem antibiotika, mikroorganizmi, odnosno bakterije postaju otporne na njih (preuzeto s: https://www.farmacia.hr/farmacia-savjetuje/clanci/57/sve-o-antibioticima/).

## 2.2. Rezistencija

Pojam otpornosti, odnosno rezistencije na antibiotike odnosi se na sposobnost organizma da preživi učinak antibiotika. Razina rezistencije izražena je u vrijednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIK ili MIC, eng. minimal inhibitory concentration), odnosno u vrijednostima minimalne koncentracije antibiotika koja zaustavlja rast bakterije. Dva osnovna tipa bakterijske otpornosti na antibiotike su urođena i stečena otpornost. Urođena je rezistencija prirođena bakteriji, a nastala je kao posljedica procesa adaptacije, odnosno prilagodbe, a ti procesi ne moraju biti vezani za određenu grupu antibiotika. Primjer su takve vrste rezistencije vanjska membrana gram-negativnih bakterija, odsutnost transportera za unos molekula antibiotika te prisutnost gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike. Stečena je rezistencija nastala kao posljedica selekcije. Bakterije, koje su prvotno bile osjetljive na neki antibiotik, s vremenom su razvile otpornost na njega, odnosno imaju razvijene mehanizme genetske prilagodbe. Mehanizmi pomoću kojih bakterije stječu rezistenciju na određene antibiotike su mutacije u genu ili genima te horizontalni prijenos gena (Duvančić 2019).

Do nastanka otpornosti ne dolazi uzimanjem antibiotika, već se rezistencija smatra prirodnim fenomenom odnosno evolucijskom prilagodbom bakterija. Posljedica je masovne transmisije plazmida koji nose gene za rezistenciju na antibiotike. Već u vrijeme stvaranja i sintetiziranja antibiotika postoje sojevi bakterije koji su otporni na njega, dok oni osjetljivi na njega, s vremenom stječu otpornost (Kalenić 2013.). Brzina rezistencije može, ali ne mora biti proporcionalna s količinom potrošenih lijekova. Primjena je antibiotika u medicini i agrikulturi postala sve češća te je istovremeno dovela do povećanja broja rezistentnih bakterija. Time su bakterije otporne na antibiotike postale velika prijetnja ljudskog zdravlju. Rezistencija ima negativan učinak na liječenje upala te ugrožava medicinske postupke poput transplantacije, zahtjevnijih operacija i kemoterapija. Porast broja rezistentnih bakterija nije moguće spriječiti, međutim pravilnom upotrebom antibiotika postoji mogućnost usporavanja njihova rasta (Duvančić 2019).

## 2.3. Rezistencija bakterije *Klebsiella pneumoniae*

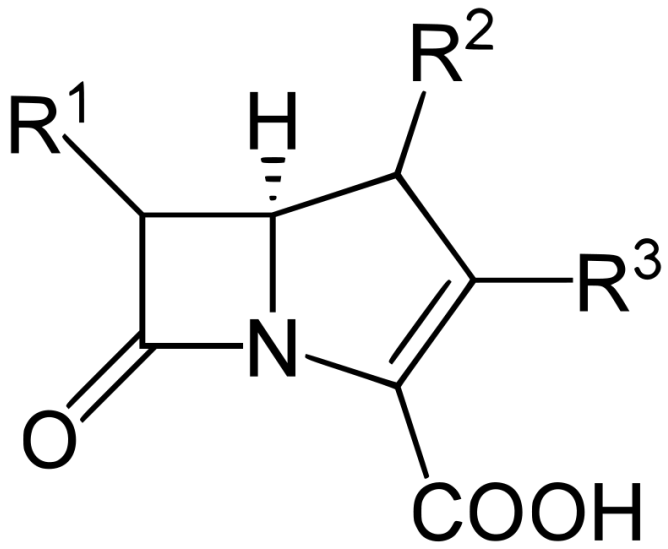
Bakterija *K. pneumoniae* najčešći je uzročnik infekcija kod ljudi. Velik se značaj pridaje njenoj otpornosti prema antibioticima. Primarno je otporna na ampicilin, antibiotik iz skupine aminopenicilina te karbenicilin, antibiotik koji pripada karboksipenicilinskoj skupini,

dok u bolnicama vrlo lako stječe rezistentnost na velik broj antibiotika koji se primjenjuju u liječenju raznih bolesti (Andrašević i sur. 2009).

U posljednjih se dvadesetak godina javlja sve veći broj sojeva *K. pneumoniae* rezistentnih na sve beta-laktamske antibiotike, najčešće korištene antibiotike u liječenju bakterijskih upala zbog svoje niske toksičnosti, visoke baktericidnosti te širokog spektra djelovanja, čija je funkcija djelovanje protiv gram-negativnih bakterija kao što je *K. pneumoniae*. U skupinu se beta-laktamskih antibiotika ubrajaju antibiotici penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenemi te inhibitori beta-laktamaze. Rezistencija je posredovana produkcijom enzima beta-laktamaze proširenog spektra. Od 2008. godine sve je češća pojava bakterijskih sojeva koji pokazuju rezistentnost na karbapeneme, parenteralne baktericidne lijekove širokog spektra djelovanja. Karbapenemi se tradicionalno smatraju prvom linijom obrane protiv teških infekcija uzrokovanih otpornim sojevima gram-negativnih bacila (Andrašević i sur. 2009).

### 2.3.1. Karbapenemi

Karbapenemi su polusintetički derivat tienamicina koji proizvodi bakterija *Streptomyces* spp. (**Slika 3.**). Od tih se baktericidnih lijekova prvi počeo koristiti imipenem, a zatim i meropenem te ertapenem, dok je na američkom tržištu dostupan i doripenem. Imaju najširi spektar djelovanja te djeluju antibakterijski na gram-pozitivne koke, velik broj bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* te nefermentativne bakterije (Bubonja-Šonje i sur. 2014).




**Slika 3.** Strukturna formula karbapenema (izvor: https://sl.wikipedia.org/wiki/Karbapenemi)

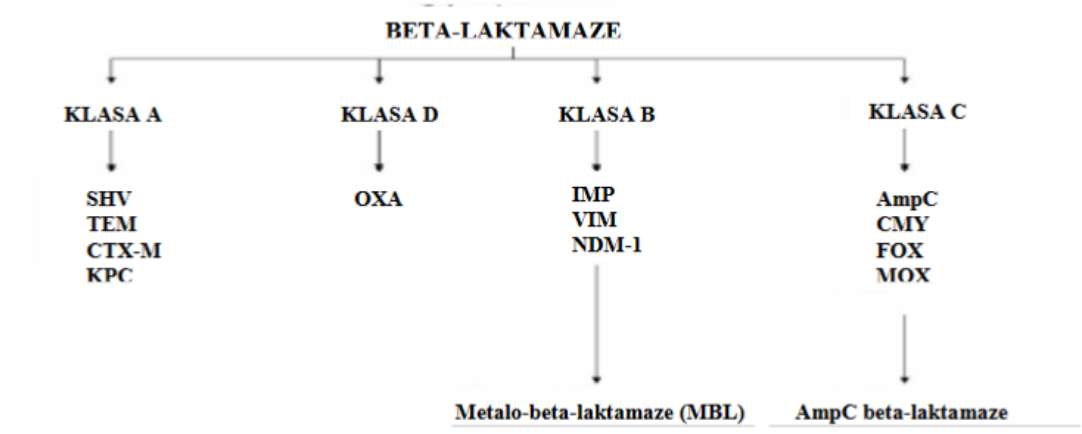
Devedesetih godina prošlog stoljeća opisane su prve bakterije porodice *Enterobacteriaceae* koje su stečeno rezistentne na karbapeneme, a njihova je otpornost posredovana kromosomski kodiranim beta-laktamazama nazvanim karbapenemaze. S obzirom na molekularnu strukturu enzimi karbapenemaze, koji uzrokuju stečenu rezistenciju na antibiotike karbapeneme, dijele se u četiri Amblerova molekularna razreda: A, B, C i D (**Slika 4.**, Bubonja-Šonje i sur. 2014.).

U skupinu A ubrajaju se karbapenemaze inhibirane klavulanskom kiselinom i tazobaktamom te se smatraju vrlo rijetkom skupinom. Hidroliziraju peniciline, prvu i drugu generaciju cefalosporina, aztreonam i karbapeneme. Najveće značenje u ovoj grupi karbapenemaza imaju KPC beta-laktamaze koje su prisutne u bakterije *K. pneumoniae*. Postoje tri vrste KPC, a međusobno se razlikuju po zamjeni jedne ili dvije aminokiseline. Vrlo su opasne zbog potencijala za epidemijsko širenje te uzrokuju visok stupanj otpornosti na karbapeneme. Ubrzo nakon što je izolirana prva KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) producirajućeg sloja *K. pneumoniae*, došlo je do naglog i opasnog širenja KPC sojeva svih enterobakterija, uključujući *K. pneumoniae*. KPC producirajući sojevi uglavnom uzrokuju sustavne bolesti, a zbog velikog epidemijskog potencijala uzrokuju bolničke infekcije. KPC enzim nosi smanjenu osjetljivost ili otpornost na sve beta-laktamske antibiotike. Prva izolacija KPC producirajuće bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* u Republici Hrvatskoj dogodila se 2011. godine, a već tijekom 2012. godine bilo je 19 izolata, dok je 2013. godine broj izolata porastao na 33. Zbog brzog širenja KPC sojeva Hrvatska se ubraja u zemlje četvrtog stupnja epidemijskog širenja (regionalno širenje) (Bubonja-Šonje i sur. 2014.).

Grupu B čine metalo-beta-laktamaze koje sadrže cink u aktivnom mjestu enzima, a osjetljive su na inhibiciju metalnim-kelatorima koji nemaju terapijsku primjenu poput EDTA, merkaptooctene te merkaptopropionske kiseline. Hidroliziraju sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme, a ne hidroliziraju monobaktam aztreonam. Prisutne su u fermentirajućim i nefermentirajućim gram-negativnim bacilima. NDM-1 karbapenemaza (New Delhi metallo-beta-lactamase) prvi je puta dokazana 2008. godine u dva izolata *K. pneumoniae*, a oba su izolata izolirana iz kliničkih uzoraka. Aktualan broj NDM izolata u većini europskih zemalja relativno je nizak u usporedbi s drugim karbapenemaza producirajućim sojevima. Prva *K. pneumoniae* s NDM-1 karbapenemazom stigla je u Hrvatsku 2009. godine. U Republici Hrvatskoj rezistencija na karbapeneme u *K. pneumoniae* uzrokovana je proizvodnjom KPC-2 beta-laktamazama (Bubonja-Šonje i sur. 2014).

D skupinu čine klasične oksacilinaze (OXA-1, OXA-2, OXA-10) koje posreduju rezistenciju na karboksipeniciline te ureidopeniciline. Neke oksacilinaze pokazuju slabu, ali

značajnu hidrolitičku aktivnost i prema karbapenemima. Kao i karbapenemaze razreda A, oksacilinaze s aktivnošću karbapenemaza uzrokuju kliničku otpornost na karbapeneme tek u kombinaciji s drugim mehanizmima rezistencije. Izdvojeni su od ostalih enzima tek 1980-ih godina. Nakon prve izolacije OXA-48 karbapenemaze iz *K. pneumoniae* 2001. godine u Turskoj, isti je bakterijski soj uzrokovao velik broj bolničkih epidemija u zemlji. U Europi se KPC karbapenemaze smatraju najrasprostranjenijim karbapenemazama među enterobakterijama. Međutim, javlja se sve veći broj OXA-48-producirajućih izolata enterobakterija (Bubonja-Šonje i sur. 2014).



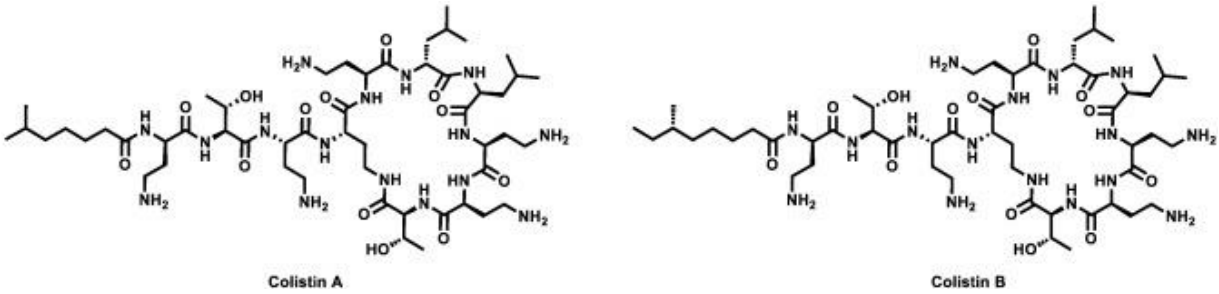

**Slika 4.** Molekularna klasifikacija beta-laktamaza po Ambleru (izvor: http://rektorat.unios.hr/molekularna/dokumenti/storage/zavrseni_doktorati/amir_ibrahimagic.pdf)

Zbog različitosti karbapenemaza i velikog potencijala širenja sojeva koji ih proizvode, javlja se potreba za brzom i točnom dijagnozom koja će omogućiti odgovarajuću primjenu antimikrobne terapije te epidemiološki nadzor nad širenjem sojeva. Budući da infekcije, koje uzrokuju gram-negativni karbapenemaza producirajući bacili posjeduju visoku stopu mortaliteta, za ove se bakterije često upotrebljava naziv „superbakterije“. Tijekom liječenja upala uzrokovanih ovim sojevima, javljaju se brojni problemi kao što je mali broj djelotvornih antibiotika, manjak kliničkih podataka o djelotvornosti antibiotika te rizik od toksičnog učinka, a odabir je antimikrobne terapije često ograničen samo na polimiksine (kolistin, polimiksin B) te tigeciklin (Bubonja-Šonje i sur. 2014.).

## 2.3.2. Antibiotik kolistin

Kolistin, poznat i pod nazivom polimiksin E, polipeptidni je baktericidni antibiotik širokog spektra djelovanja protiv gram-negativnih bakterija kao što su vrste *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. te *K. pneumoniae*. Antibakterijska aktivnost kolistina prepoznata je četrdesetih godina 20. stoljeća, točnije 1947. godine kada je i prvi puta izoliran iz bakterija tla *Paenibacillus polymyxa* (Duvančić 2019.).

Polikationski je ciklički amfipatični polipeptid, odnosno istovremeno je i hidrofilni te hidrofobni. Građen je od cikličkog heptapeptida koji posjeduje tripeptidni bočni lanac acetiliran na N-kraju. S obzirom na molekularnu razinu sastoji se od smjese cikličkih polipeptida A i B koji se razlikuju u strukturi bočnog lanca (**Slika 5.**). Dok kolistin A u svom sastavu ima 6-metiloktansku kiselinu, kolistin B sadrži 6-metilheptansku kiselinu (Duvančić 2019.).




**Slika 5.** Strukturna formula kolistina A i B (izvor: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365917300585)

Mehanizam antimikrobne aktivnosti kolistina vezanje je na lipopolisaharide te fosfolipide u vanjskoj staničnoj membrani gram-negativnih bakterija, odnosno kationski polipeptidi dolaze u interakciju s anionskim lipopolisaharidima vanjske membrane bakterije. Kompetitivno istiskuju dvovalentne katione magnezija i kalcija iz fosfatnih skupina membranskih lipida, a gubitkom kationa dolazi do poremećaja u vanjskoj membrani, propuštanja unutarstaničnih sadržaja te u konačnici do smrti bakterije (Bilić 2015.).

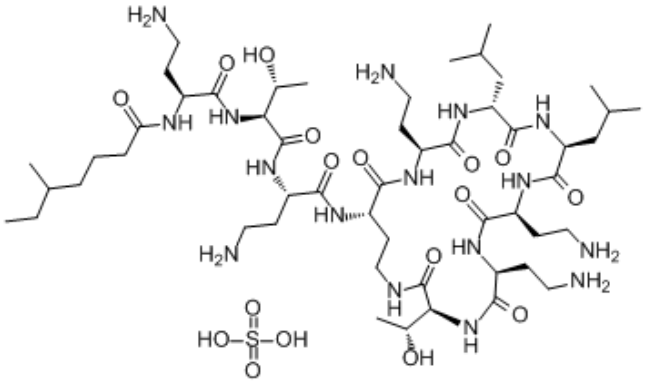
U mnogim se zemljama svijeta antibiotik kolistin upotrebljava u agrikulturi i veterinarskoj medicini za uzgoj te kontrolu infekcija uzrokovanih bakterijama porodice *Enterobacteriaceae* na farmama životinja, dok je u ljudskoj medicini upotreba tog antibiotika donedavno bila ograničena zbog nuspojava koje je uzrokovao te se koristio kao antibakterijski terapeutik „posljednje obrane“ (Duvančić 2019.). Jedan je od pet najčešće korištenih antibiotika u životinja koje su namijenjene za prehranu ljudi. Budući da se uglavnom

primjenjuje u liječenju stada ili jata, njegova potrošnja u životinja daleko je veća od one u ljudi (Bilandžić 2018.).

Kolistin se za liječenje upala uzrokovanih gram-negativnim bakterijama počeo upotrebljavati od 1959. godine. Klinička je učinkovitost kolistina u liječenju osjetljivih sojeva nepredvidljiva, osobito u liječenju pneumonija zbog slabog prodora lijeka u tkivo pluća te različitih nuspojava poput nefrotoksičnosti te neurotoksičnosti (Duvančić 2019.). Zbog tih se nuspojava, rjeđe upotrebljava od 1970-ih godina kada su se na tržištu pojavili manje toksični aminoglikozidi te drugi antibiotici. Ponovno je postao klinički značajan pojavom sve većeg broja rezistentnih crijevnih bakterija ili enterobakterija, posebice bakterija koje su otporne na karbapeneme koji se koriste za liječenje teških infekcija (Bilandžić 2018.). Nova su istraživanja upotpunila saznanja o farmakokinetici te farmakodinamici kolistina, a poboljšanje farmakoloških osobina antibiotika te prilagodba doze povećali su djelotvornost lijeka i učinili ga sigurnijim za primjenu. U istraživanjima je predložena primjena povećane doze lijeka kako bi se brzo postigla aktivna terapijska koncentracija na mjestu upale. *In vitro* osjetljivost kliničkih izolata KPC producirajućih bakterija na kolistin kreće se između 90-100%. Kolistin je jedini učinkovit antibiotik koji se koristi za liječenje upala krvožilnog sustava. Upotrebljava se za liječenje upala uzrokovanih multiplorezistentnim gram-negativnim bakterijama bez obzira na dob bolesnika (Tešović 2017.).

Komercijalno su dostupna dva oblika antibiotika kolistina – kolistin sulfat (**Slika 6.**) te natrijev kolistimetat ili kolistin metansulfonat (CMS) (Bilić 2015.).

Kolistin sulfat može se konzumirati oralno kao tableta te sirup ili kao vodena otopina za oči i uši, dok se kolistin metansulfonat koristi parenteralno, odnosno direktno se unosi u tkivo injektiranjem u venu, mišić ili pod kožu. Kolistin metansulfonat nastaje kao produkt reakcije kolistina, formaldehida te natrijevog bisulfita. U vodenom se mediju te *in vivo* u tjelesnim tekućinama pretvara u biološki aktivan kolistin (Bilić 2015.).



**Slika 6.** Strukturna formula kolistin sulfata (izvor: https://focusbio.com.au/products/colistin-sulfate/)

## 3. Okolišni izolati bakterije *Klebsiella pneumoniae* i njihova rezistencija

### 3.1. Uvod

Rezistencija na razne antibiotike, posebice treću generaciju cefalosporina (3GC) te karbapeneme, predstavlja veliku prijetnju zdravstvu u cijelom svijetu. Donedavno je otpornost smatrana samo problemom kliničke prirode, no prirodni su ekosustavi prepoznati kao važan izvor gena za rezistenciju na antibiotike (ARGs) (Caltagirone i sur. 2017.).

U vodenom okruženju rasprostranjenost bakterija, koje pokazuju otpornost na antibiotike te potječu iz različitih antropogenih izvora poput bolničkih i komunalnih otpadnih voda, neprestano raste. Visoke koncentracije antibiotika ili njihovih aktivnih metabolita ispuštenih zajedno s urinom i fekalijama u otpadne vode povećavaju selektivni pritisak u populaciji bakterija te tako omogućuju razvitak generacija mikroorganizama rezistentnih na antibiotike. Također, površinska voda ima mogućnost djelovanja kao vruća točka otpornosti gdje bakteriofagi (bakterijski virus) ili integroni (mehanizmi koji omogućuju bržu bakterijsku prilagodbu i evoluciju) omogućuju širenje gena za rezistenciju na antibiotike, dok novi otporni sojevi nastaju horizontalnim ili lateralnim prijenosom gena (Caltagirone i sur. 2017.).

Bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* karakteristične su po prisutnosti beta-laktamaze, enzima koji sadrži više od 2 000 nizova aminokiselina. Neke od klinički najznačajnijih beta-laktamaza su penicilinaze skupine A, beta-laktamaze proširenog spektra (ESBLs), cefalosporinaze (AmpC) te karbapenemaze. Geni enzima beta-laktamaze identificirani su u bakterijama koje su izolirane iz površinskih voda te postrojenja za obradu otpadnih voda. Zbog raznovrsnosti ovih enzima, u suzbijanju je infekcija često potrebno kombinirati antibiotike, primjerice karbapenemi se koriste zajedno sa kolistinom (Caltagirone i sur. 2017.).

Problem kojeg treba biti svjestan jest sve veća rezistencija bakterija na antibiotik kolistin, „krajnji“ antibiotik koji se koristi za liječenje kritičnih infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim gram-negativnim patogenim bakterijama.

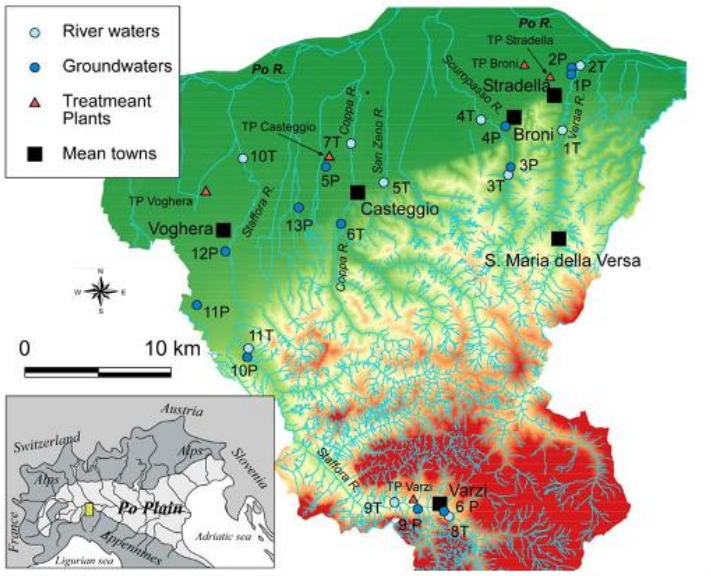
## 3.2. Istraživanje 2014./2015. godine u području Oltrepò Pavese

U razdoblju od prosinca 2014. godine pa do studenog 2015. godine provedeno je istraživanje na temelju kojeg se odredila stopa rezistencije na antibiotike u bakterija uzorkovanih iz različitih izvora vode, ali i prisutnost gram-negativnih bakterija koje su rezistentne na treću generaciju cefalosporina (3GC). Ispitivanje se provodilo na području Oltrepò Pavese koje je smješteno u Pavii, provinciji južno od rijeke Po. Taj je prostor gusto naseljen te podržava mnoge poljoprivredne i industrijske djelatnosti koje zagađuju plitke vodonosnike, stoga predstavlja idealan model za procjenu uloge vodenog okoliša kao potencijalnog rezervoara za širenje i evoluciju gena za rezistenciju na antibiotike i njihovih vektora. Način na koje ljudi dolaze u kontakt s ovim rezistentnim bakterijama konzumiranje je usjeva uzgojenih pomoću onečišćenog mulja, dobivenog u uređajima za pročišćavanje otpadne vode, koji se koristio kao gnojivo te pijenje kontaminirane podzemne ili površinske vode. Ukoliko bakterije uđu u ljudski organizam, počinju širiti svoje ARG-ove na ljudski mikrobiom, odnosno na mikroorganizme koji žive u i na ljudskom tijelu (Caltagirone i sur. 2017.).

Svrha ovog istraživanja bila je ispitivanje pojave bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* otpornih na cefotaksim u vodenom ekosustavu Oltrepò Pavese, određivanje broja i postotka gram-negativnih bakterija rezistentnih na treću generaciju cefalosporina tijekom cijelog razdoblja ispitivanja te određivanje temeljnih odrednica i procjena najproblematičnijih izolata (Caltagirone i sur. 2017.).

Kako bi se odredila stopa rezistencije na antibiotike, na području Oltrepò Pavese pregledano je jedanaest bunara, pet potoka te četiri postrojenja za obradu otpadnih voda

(**Slika 7.**). Iako je istraživanje provedeno na ograničenom području, mikrobiološki rezultati, dobiveni ovdje, mogu se smatrati reprezentativnim, budući da je ovakvo hidrogeološko područje tipično i za mnoge druge ravnice rijeke Po (Caltagirone i sur. 2017.).




| Sites | Streams | Sites | Wells | Sites | Treatment Plants |
|---|---|---|---|---|---|
| 1T | Versa upstream | 1P | Cassinassa 4 | **Broni TP** | Treatment Plant of Broni |
| 2T | Versa Durina downstream | 2P | Cassinassa 3 | **Stradella TP** | Treatment Plant of Stradella |
| 3T | Scuropasso upstream | 3P | Monteguzzo | **Voghera TP** | Treatment Plant of Voghera |
| 4T | Scuropasso downstream | 4P | Eseguiti 2 | **Varzi TP** | Treatment Plant of Varzi |
| 5T | Riale San Zeno | 5P | Lottona | | |
| 6T | Coppa upstream | 6P | Belcredi | | |
| 7T | Coppa downstream | 9P | Cagnano 2 | | |
| 8T | Staffora Varzi upstream | 10P | Calbicella | | |
| 9T | Staffora Varzi downstream | 11P | Bidella | | |
| 10T | Staffora Loc. Oriolo | 12P | S. Maria Bianca | | |
| 11T | Staffora Rivanazzano | 13P | Montebello | | |

**Slika 7.** Mjesta uzorkovanja na području Oltrepò Pavese (izvor: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02232/full)

U uzorcima vode iz bunara, potoka te postrojenja za obradu otpadnih voda utvrđeno je prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra (ESBLs), cefalosporinaze (AmpC), karbapenemaze i MCR- 1 gena u bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Uzorkovanje se provodilo jednom mjesečno od 2014. godine pa do 2015. godine i u tom je vremenu ispitivanja prikupljeno ukupno 246 uzoraka vode. Uzorci na potocima (1T-11T) uzeti su od 9 do 11 puta, dok su bunari (1P-13P) uzorkovani 10-12 puta. Budući da je za uzorkovanje u postrojenjima za obradu otpadnih voda bila potrebna posebna dozvola, ona su pregledavana rjeđe, samo 3-6 puta. Prikupljeni su uzorci stavljeni u aseptične plastične boce kako bi bili zaštićeni od kontaminacije te su pohranjeni na 4°C i analizirani unutar 24 sata nakon sakupljanja (Caltagirone i sur. 2017.).

Definirani volumen vode iz bunara, potoka ili postrojenja za obradu otpadnih voda analiziran je metodom membranske filtracije. Kako bi se odredili potencijalni proizvođači beta-laktamaze proširenog spektra (ESBLs) te cefalosporinaze (AmpC), membranski su filtri postavljeni na neselektivnu agar te selektivnu podlogu Mac Conkey agar koja je sadržavala 8 mg/l cefotaksima. Broj je bakterija procijenjen nakon jednodnevne inkubacije na temperaturi od 37°C. Postotak otpornosti na treću generaciju cefalosporina izračunat je usporedbom broja kolonija poraslih na Mac Conkey agaru s antibiotikom u odnosu na neselektivnu podlogu (Caltagirone i sur. 2017.).

Europska mreža za nadzor otpornosti na antimikrobne pripravke (EARS-Net) u 2011. godine opisala je neprestani trend porasta karbapenemaze proizvedene iz invazivnih uzoraka bakterije *K. pneumoniae* nađenih na odjelu intenzivne njege u talijanskim bolnicama. Nedavni su podaci pokazali da se kompleks 258 *K. pneumoniae*, koji proizvodi KPC, često nalazi i u bolesnika na gerijatrijskim ili medicinskim odjeljenjima. Također, nedavno je gen MCR-1 otkriven u povrću, životinjskoj hrani, asimptomatskim nosačima te hospitaliziranim pacijentima u Kini. Što se tiče okoliša, gen MCR-1 nađen je na Maleziji, u rijeci u Švicarskoj te kanalizacijskoj vodi u Španjolskoj. U ovom je istraživanju MCR-1.2 varijanta gena otkrivena u 7T bakterije *E. coli*. Mogućnost širenja plazmida, koji luče gen MCR-1 u multirezistentnim organizmima, predstavlja velike izazove u liječenju i kontroli infekcija. Primjerice, kada su antibiotici beta-laktami, aminoglikozidi ili kinoloni neučinkoviti, kolistin se koristi kao alternativni lijek (Caltagirone i sur. 2017.).

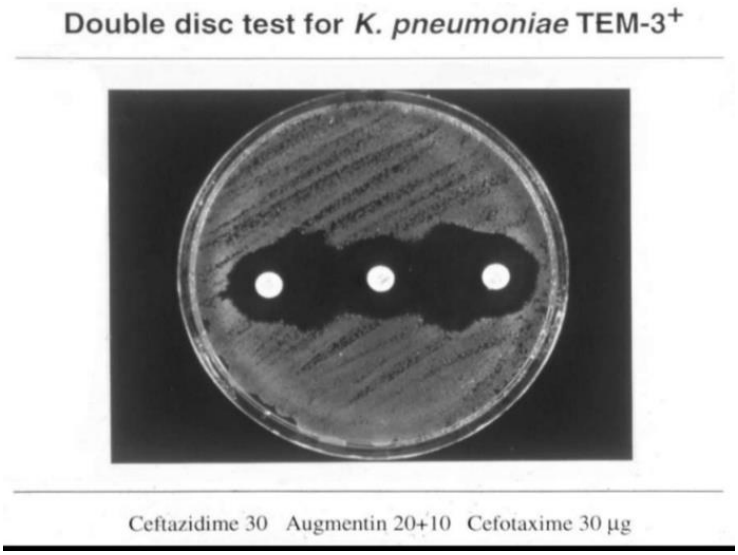
### 3.2.1. Identifikacija bakterija

Identifikacija bakterijskih kolonija i ispitivanje njihove osjetljivosti provedene su korištenjem poluautomatskog sustava MicroScan autoSCAN-4, a ESBLs, karbapenemaze i determinante rezistentne na kolistin određene su lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranjem te metodom kromosomskog mikročipa (Caltagirone i sur. 2017.).

Za određivanje fenotipske rezistencije na antibiotike upotrebljavaju se metode kojima se MIC antibiotika poput metode mikrodilucije, metode dilucije u agaru te E-testa. Primjerice, rezistencija na kolistin mora se potvrditi metodom mikrodilucije prema EUCAST (2015.) kriterijima.

Dobiveni rezultati osjetljivosti u bakterija interpretirani su prema kliničkim smjernicama EUCAST (2015), a *E. coli* korištena je kao kontrolni soj. Detekcija ESBLs provedena je pomoću kromogenog medija ChromArt ESBLs i testa sinergije dvostrukog diska

(**Slika 8.**), a pritom je korišten piperacilin-tazobaktam, cefotaksim, cefepim, ceftazidim te aztreonam, dok se rezistencija na cefoksitin i treću generaciju cefalosporina smatrala markerom proizvodnje cefalosporinaze (AmpC) (Caltagirone i sur. 2017).




**Slika 8.** Test sinergije dvostrukog diska (izvor: https://www.slideshare.net/doctorrao/laboratory-detection-of-esbl)

Genomska je DNA odvojena upotrebom kompleta NucleoSpin. Kako bi se otkrila prisutnost beta-laktamaze proširenog spektra, karbapenemaze te MCR-1 kodirajućih gena korišten je PCR. U slučaju beta-laktamaze proširenog tipa (ESBLs) te karbapenemaze denaturacija je započela na temperaturi od 95°C x 5 minuta, dok je kod gena MCR-1 započela na temperaturi od 94°C x 5 minuta. Nakon što su očišćeni, PCR proizvodi podvrgnuti su procesu dvostrukog nizanja, a nastale su sekvence analizirane prema softveru BLAST programa (Caltagirone i sur. 2017.)

### 3.2.2. Rezultati istraživanja

Od 246 sakupljenih uzoraka bakterija, njih 48% prikupljeno je u potocima, 43.9% njih bilo je iz bunara, dok je 8.1% pripadalo postrojenjima za obradu otpadnih voda. Polovica prikupljenih mikroorganizama, točnije njih 132, pripadalo je porodici *Enterobacteriaceae*, a dobiveni su na selektivnoj podlozi MCA + CTX (Caltagirone i sur. 2017).

Visoke su razine bakterijske kontaminacije te stope rezistentnosti na cefotaksim konstantno opažene u uzorcima iz postrojenja za obradu otpadnih voda, dok su sezonske promjene zabilježene u uzorcima iz potoka, odnosno fluktuacije su se odvijale ovisno o području uzorkovanja. Velik je broj bakterija detektiran u dva bunara smještena u blizini

postrojenja za obradu otpadnih voda Varzi što ukazuje na ogroman rizik od onečišćenja u ovom području (Caltagirone i sur. 2017.).

Prosječan se broj bakterija kretao od 0 do 10 000 CFU/mL (**Tablica 1.**). Veće su koncentracije bakterija primijećene u uzorcima koji su prikupljeni u postrojenjima za obradu otpadnih voda, dok je u uzorcima iz potoka bio vidljiv trend fluktuacije, odnosno promjenjivosti iz mjeseca u mjesec. Što se tiče rezultata iz bunara, najveće su koncentracije bakterija pronađene u bunarima 6P, 9P te 10P. Općenito, postotci rezistencije na cefalosporine u Gram-negativnih bakterija, dobiveni usporedbom rasta bakterija na MCA te MCA + CTX, kretali se u rasponu između 0 i 100% (Caltagirone i sur. 2017.).

**Tablica 1.** Broj bakterija i postotak rezistencije na cefalosporine (izvor: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02232/full)

| Site[a] | | Avg no. of | | |
|---|---|---|---|---|
| | N[b] | CFU/ml$^{-1}$ (±SE) | % CTX-R[c] | % CTX-R range[d] |
| 1T | 11 | 4,625 ± 1,552 | 41 | 0–100 |
| 2T | 11 | 4,627.3 ± 1,551 | 46 | 0–100 |
| 3T | 11 | 3,694.9 ± 1,507 | 5.3 | 0–40 |
| 4T | 11 | 5,764.3 ± 1,997 | 68 | 0–100 |
| 5T | 11 | 7,317.3 ± 1,385 | 49.5 | 0–100 |
| 6T | 9 | 4,500 ± 1,739 | 42.7 | 0–100 |
| 7T | 11 | 8,272.7 ± 1,159 | 46 | 0–100 |
| 8T | 10 | 1,023.3 ± 997.4 | 3.75 | 0–32.4 |
| 9T | 11 | 3,709.1 ± 1,504 | 25.3 | 0–100 |
| 10T | 11 | 3,696.8 ± 1,507 | 6.4 | 0–40 |
| 11T | 11 | 2,812.7 ± 1,392 | 18.8 | 0–90 |
| 1P | 12 | 16.4 ± 6.8 | 20 | 0–100 |
| 2P | 10 | 2,033.5 ± 1,328 | 12.9 | 0–100 |
| 3P | 10 | 1,039.5 ± 995 | 10 | 0–0.2 |
| 4P | 10 | 36 ± 15 | 10.3 | 0–77 |
| 5P | 10 | 12.9 ± 5.3 | 10 | 0–100 |
| 6P | 10 | 8,020 ± 1,320 | 7 | 0–25 |
| 9P | 10 | 9,005 ± 995 | 13 | 0–50 |
| 10P | 11 | 6,050 ± 1,612 | 6.6 | 0–25 |
| 11P | 10 | 17.5 ± 10 | 5 | 0–50 |
| 12P | 11 | 1,003 ± 999 | 0 | 0 |
| 13P | 10 | 1,028.2 ± 864 | 18 | 0–100 |
| TP Varzi | 6 | 10,000 | 50.8 | 25–100 |
| TP Broni | 3 | 10,000 | 100 | 100 |
| TP Voghera | 3 | 5,100 ± 4,000 | 75 | 25–100 |
| TP Stradella | 3 | 6,733.3 ± 3266 | 52 | 25–100 |

Sezonske promjene ukupnog broja bakterija su procijenjene (**Tablica 2.**). Najniži je broj bakterija zabilježen u listopadu. Od početka zime pa do kraja proljeća vidljiv je porast bakterija u potocima, dok je do smanjenja došlo u razdoblju ljeta i jeseni. Najveći je postotak gram-negativnih bakterija, koje su pokazale otpornost na cefalosporine, utvrđen u svibnju, a najniža je vrijednost pronađena u rujnu (Caltagirone i sur. 2017).

**Tablica 2.** Prosječne vrijednosti ukupnog broja bakterija i postotka rezistencije na cefalosporine (izvor: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02232/full)

| | Winter | Spring | Summer | Autumn |
|---|---|---|---|---|
| Bacterial Count (CFU/ml) | 5,196.485 ± 862 | 6,687.636 ± 815.45 | 3,137.4 ± 1,005 | 2,231.179 ± 766.8 |
| % CTX-Resistance | 36.3 ± 6.9 | 46.3 ± 7.8 | 12.8 ± 2.95 | 15.5 ± 6.2 |

Na podlozi MCA + CTX naraslo je ukupno 132 bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*: 62.1% bakterija naraslo je iz uzoraka uzetih iz potoka, 31.1% bakterija iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, a 6.8% bakterija iz uzoraka iz bunara. Od 132 enterobakterije 22.7% njih pokazalo je sinergijski učinak, odnosno kombinirani učinak dviju ili više bakterija koji ima veći značaj u odnosu na pojedinačne učinke svakog od njih, pomoću DD-testa, a samo 5 enterobakterija pripadalo je vrsti *K. pneumoniae*. 1.5% enterobakterija potvrđeno je kao proizvođač karbapenemaza, a 0.8% njih proizvodilo je cefalosporinaze (AmpC). Svi okolišni izolati bakterija *E. coli* i *K. pneumoniae* pokazali su rezistentnost na treću generaciju cefalosporina (3GC). Otpornost na sve tipove karbapenema (ertapenem, meropenem i imipenem) pokazalo je 13.3% bakterija *E. coli* te 22.2% bakterija *K. pneumoniae*. Također, značajno je da 60% izolata *E. coli*, koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBLs), pokazuje rezistentnost na fluorokinolone. Samo 20% bakterija *E. coli* te 14.2% bakterija *K. pneumoniae* rezultiralo je otpornošću na kolistin. Klinička je otpornost na kolistin potvrđena jedino u soju 7T bakterije *E. coli* metodom mikrodilucije, dok je KPC/MBL test dao pozitivne rezultate za 9P i 5TP sojeve bakterije *K. pneumoniae* (Caltagirone i sur. 2017.).

### 3.2.3. Geni otpornosti

Tijekom jednogodišnjeg istraživanja identificirano je ukupno 33 enterobakterija, koje proizvode CTX-M-, SHV-, DHA-, KPC-tipove gena, iz jedanaest bunara, pet potoka i četiri postrojenja za obradu otpadnih voda. U velikom broju enterobakterijskih vrsta, koje su otporne na treću generaciju cefalosporina (3GC), nije otkriven mehanizam proizvodnje beta-laktamaze. Otkrivene su beta-laktamaze uglavnom bile CTX-M-tipa, slijedi ga SHV-tip, TEM-1 te KPC-tip. Visoka je razina neosjetljivosti fluorokinolona otkrivena u bakterije *E.coli*, koja je pokazala rezistenciju na treću generaciju cefalosporina (3GC). To otkriće predstavlja velik problem, budući da se ova vrsta antibiotika često koristi u liječenju infekcija mokraćnog sustava (Caltagirone i sur. 2017.).

Gen $bla_{CTX\text{-}M}$ utvrđen je u 63.6.% bakterijskih izolata iz svih odjeljaka vode koji su uzorkovani, a u četiri je slučaja taj gen koegzistirao s drugim odrednicama beta-laktamaze. Najčešće utvrđene varijante gena $bla_{CTX\text{-}M}$ bile su $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}28}$ te $bla_{CTX\text{-}M\text{-}138}$. PCR i sekvenciranje potvrdili su prisutnost determinanti $bla_{KPC\text{-}2}$ i $bla_{KPC\text{-}3}$ u sojevima 5TP i 9P bakterije *K. pneumoniae* (Caltagirone i sur. 2017.).

Konjugacija je provedena na svih 25 sojeva pozitivnih na beta-laktamaze proširenog spektra te karbapeneme, a horizontalni je prijenos gena zabilježen u 60% okolišnih izolata. Profili su rezistentnosti davatelja i transkonjuganata potvrdili horizontalni prijenos gena otpornosti treće generacije cefalosporina, karbapenema i kolistina, a PCR analizom potvrđena je prisutnost rezistentnih gena u svim transkonjugantima. U usporedbi sa sojevima J53 te J62 bakterije *E. coli*, koji su korišteni kao primatelji, transkonjuganti su pokazali manju osjetljivost na treću generaciju cefalosporina (3GC) (**Tablica 3.**). Dok u slučaju KPC-3 konjugacija nije uspjela, prijenos je svojstava otpornosti antibiotika kolistina iz MCR-1.2 bio moguć (Caltagirone i sur. 2017.).

Gel-elektroforeza s pulsnim poljem, provedena na svih 15 bakterijskih sojeva *E. coli*, pokazala je klonalnu raznolikost, dok je pet od sedam sojeva bakterije *K. pneumoniae*, koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra te karbapenemaze, pokazivalo jednakost (Caltagirone i sur. 2017.).

**Tablica 3.** Obilježja transkonjuganata rezistentnih na treću generaciju cefalosporina; *E. coli* i *K. pneumoniae* (izvor: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02232/full)

| Isolates | Resistance[a] | Enzyme | Inc (Replicon)[b] |
|---|---|---|---|
| 1T *E. coli* | **AMP**, **CAZ**, **CTX**, **FEP**, **CIP**, **PIP**, **LEV**, **MOXI**, **NOR**, TOB, **TMS**. | **CTX-M-1** | IncF (FIB) |
| 3T *E. coli* | AMC, **AMP**, CAZ, **CTX**, **FEP**, **PIP**, ERT, MEM, TZP, **CIP**, **CL**, **MOXI**, **NOR**. | **CTX-M-28**, **TEM-1** | IncP (P), IncF(FIB) |
| 7T *E. coli* | AMC, AMP, CAZ, PIP, TMS, **CO**. | CTX-M-1, **MCR-1.2**, SHV-12 | IncX4 (X4) |
| 11T *E. coli* | **AMC**, AMP, CAZ, **CTX**, FEP, **PIP**, TZP. | **SHV-12** | IncF (FIB) |
| 1TP *E. coli* Broni | AMC, **AMP**, **CTX**, CAZ, **FEP**, **PIP**, **CIP**, **LEV**, **MOXI**, **NOR**, TOB, **CL**, FOS. | **CTX-M-28** | IncHI2 (HI2), IncF (FIA, FIB) |
| 2TP *E. coli* Broni | **AMP**, CAZ, **CTX**, **FEP**, **PIP**, CIP, **LEV**, MOXI, NOR, CL. | **CTX-M-14** | IncX1(X1) |
| 1TP *E. coli* Varzi | **AMP**, **CTX**, **FEP**, **PIP**, TMS. | **CTX-M-15** | IncT (T) |
| 2TP *E. coli* Varzi | **AMP**, **CTX**, **CIP**, **LEV**, **MOXI**, **NOR**, PI, TMS. | **CTX-M-15** | IncF (FIA) |
| 3TP *E. coli* Varzi | **AMP**, **CTX**, CAZ, FEP, PIP. | **CTX-M-15**, TEM-1 | IncF (FIA, FIB) |
| 6TP *E. coli* Varzi | **AMP**, **CTX**, **CAZ**, **PIP**, **CIP**, **LEV**, **MOXI**, **NOR**, **TOB**, **TMS**. | **CTX-M-1**, **SHV-5** | IncF (FIA, FIB) |
| 1TP *E. coli* Stradella | **AMP**, **CTX**, **FEP**, CIP, CO,GM, MOXI, NOR, LEV, **TMS**, TOB. | **CTX-M-1** | IncF (FIA, FIB) |
| 1TP *K. pneumoniae* Varzi | **AMP**, **CTX**, **FEP**, **PIP**. | **CTX-M-15** | IncF (FIA) |
| 3TP *K. pneumoniae* Varzi | **AMP**, CAZ, **CTX**, FEP, PIP, TMS. | **CTX-M-28** | IncN (N) |
| 5TP *K. pneumoniae* Varzi | **AMC**, **AMP**, **CTX**, CAZ, FEP, MEM, **ERT**, **TZP**, CIP, NOR, MOXI, FOS, CL, GM, TMS. | **TEM-1**, **KPC-2** | IncFIIk (FIIk, FIBKQ) |
| 9T *K. oxytoca* | **AMP**, **CTX**, **FEP**, FOS, **PIP**. | **CTX-M-1** | IncN (N), R (NA[c]) |

Pojava beta-laktamaza proširenog spektra (ESBLs), DHA-, karbapenemaza te MCR-1.2 u okolišnih enterobakterija naglašava važnost poboljšanja nadzora i sanacije površinskih i podzemnih voda u području Oltrepò Pavese. Potrebno je poduzeti određene mjere kako bi se smanjila rezistencija bakterija na antibiotike. Primjerice, nove strategije za obradu otpadnih

voda (upotreba pješčanih filtara ili stroža dezinfekcija klorom) spriječile bi puštanje rezistentnih bakterija u vodeni okoliš. Ovi su rezultati potvrdili hipotezu da okolišna voda predstavlja važan rezervoar skrivene otpornosti (Caltagirone i sur. 2017).

# 4. Preživljavanje bakterije *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima vode

## 4.1.Istraživanje

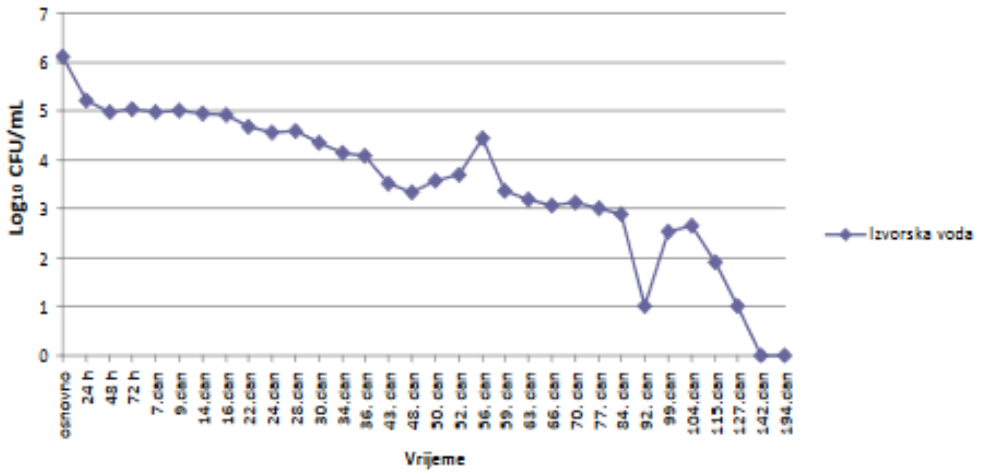
Bolesti, koje se prenose mikrobiološki kontaminiranom vodom, predstavljaju značajan javnozdravstveni problem. S obzirom na mogućnost izazivanja upala, provedene su brojne epidemiološke studije s ciljem praćenja epidemija koje nastaju kao posljedica kontakta s mikrobiološki onečišćenom vodom, a rezervoarima za patogene organizme u vodenom okolišu smatraju se ljudi, životinje te sam okoliš (Štimac i sur. 2009).

Istraživanjem, koje je provedeno 2009. godine u Hrvatskoj, ispitivalo se preživljavanje bakterije *K. pneumoniae*, odnosno njena soja Caroli (O1:K2) u različitim uzorcima vode poput morske vode, destilirane vode, vode iz slavine te prirodne izvorske vode na temperaturi okoliša. Budući da su se u istraživanju koristili vodeni mediji bez ikakvih hranjivih dodataka, htjelo se istražiti ponašanje spomenute bakterijske vrste u nutritivno oskudnim uvjetima. Nakon 18 sati uzgoja bakterije *K. pneumoniae*, pripremljene su suspenzije bakterija u različitim uzorcima vode te pohranjene u inkubator (Štimac i sur. 2009., Jelić i sur. 2019.).

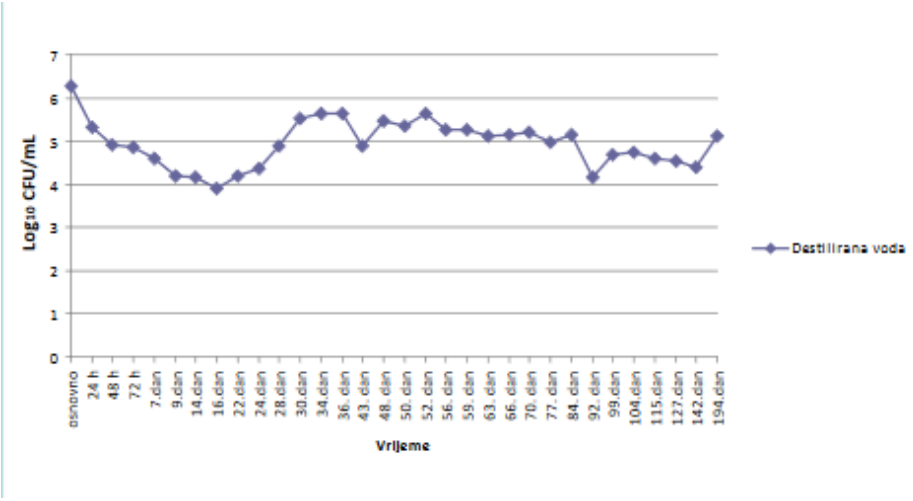
## 4.2. Rezultati istraživanja

Dobiveni su rezultati pokazali da broj bakterija *K. pneumoniae* opada u uzorku prirodne izvorske vode pH vrijednosti 7.96, ali može preživjeti u njoj (**Slika 10.**). Međutim, zbog nutritivno oskudnih uvjeta, *K. pneumoniae* se nije umnažala, to jest broj se bakterija značajno smanjio do potpunog nestanka, dakle izvorska je voda najnepovoljnija za preživljavanje *K. pneumoniae*. U destiliranoj vodi pH vrijednosti 6.52 (**Slika 11.**) broj bakterija smanjio se tijekom prvih šesnaest dana, a nakon adaptacije na vodeni medij, bakterija se počela umnažati te je njen broj postupno rastao. Stoga, destilirana je voda najpovoljniji medij za preživljavanje *K. pneumoniae*. Boljem opstanku u destiliranoj vodi pridonio je povoljniji pH vodene otopine. U vodi iz slavine došlo je do uočljivog pada broja bakterija, no nakon prilagodbe, počela se umnažati. Nakon devetog je dana dostigla vrijednost koju zadržava sve do kraja ispitivanog razdoblja, dok se u morskoj vodi broj bakterija smanjio prema kraju ispitivanja. Na temelju

tog je istraživanja potvrđeno da je voda vrlo povoljan medij za preživljavanje *K. pneumoniae*, čak i u uvjetima nutritivnog deficita, kroz dugo vremensko razdoblje, točnije 142 dana (Štimac i sur. 2009.). U vodi rijeke Krapine *K. pneumoniae* se umnažala zbog dostupnosti hranjivih tvari u vodi i preživjela 50 dana praćenja (Jelić i sur. 2019.).




**Slika 10.** Preživljavanje vrste *K. pneumoniae* u prirodnoj izvorskoj vodi (izvor: Štimac i sur. 2009.)




**Slika 11.** Preživljavanje vrste *K. pneumoniae* u destiliranoj vodi (izvor: Štimac i sur. 2009.)

# 5. Zaključak

*K. pneumoniae* gram-negativni je bacil iz porodice *Enterobacteriaceae* koji uzrokuje širok spektar infekcija u životinja i ljudi. *K. pneumoniae* razvila je otpornost i na gotovo sve antibiotike koji se koriste u klinici. *K. pneumoniae* posjeduje sposobnost stjecanja te prenošenja gena za rezistenciju, odnosno pokazuje stečenu rezistenciju, nastalu kao posljedica prirodnog odabira. Njeni okolišni izolati predstavljaju rezervoar tih gena koji se mogu prenijeti i na druge bakterijske vrste. Najčešći je mehanizam rezistencije *K. pneumoniae* na beta-laktamske antibiotike sinteza beta-laktamaza.

Neki sojevi *K. pneumoniae* pokazuju smanjenu osjetljivost prema starijim cefalosporinima zbog produkcije plazmidnih TEM ili SHV beta-laktamaza kodiranih R-plazmidima. TEM-1 i TEM-2 najrasprostranjenije su plazmidne beta-laktamaze u porodici *Enterobacteriaceae*, a SHV-1 i SHV-2 pokazuju dominaciju kod *K. pneumoniae*. SHV-1 kod *K. pneumoniae* kodira kromosomalno, a smatra se uzročnikom rezistencije na ampicilin i karbenicilin, dok su TEM-1 i TEM-2 povezani s visokim stupnjem otpornosti na peniciline. Zapažena je i pojava rezistencije na treću generaciju cefalosporina uvjetovana produkcijom beta-laktamazama proširenog spektra nastalih mutacijom TEM i SHV enzima. CTX predstavlja hidrolitičku aktivnost beta-laktamaza prema cefotaksimu. Neki CTX-M tipovi mogu hidrolizirati i ceftazidim te cefepim. Beta-laktamaza KPC-tipa, jedna od najistaknutijih karbapenemaza, sposobna je hidrolizirati gotove sve beta-laktame. Povezanost gena $bla_{\mathrm{KPC}}$ i širokog spektra plazmida utječe na razvoj rezistencije na antibiotike. Svi okolišni izolati, koji proizvode KPC, pokazuju otpornost na ampicilin, amoksicilin, piperacilin, sve cefalosporine te karbapeneme, trimetoprim-sulfametoksazol i ciprofloksacin. Također, gen $bla_{\mathrm{KPC\text{-}2}}$ pronađen je u *K. pneumoniae*, dok prisutnost drugih gena, koji kodiraju karbapenemazu, nije zamijećena. Iako se bolnice smatraju primarnim izvorom enterobakterija koje proizvode karbapenemaze, sposobnost preživljavanja *K. pneumoniae* u riječnoj vodi ukazuje na njen potencijal prenošenja gena za rezistenciju na antibiotike u različite prirodne bakterijske ekosustave.

Za razliku od većine patogena, bakterija *K. pneumoniae* je ubikvitarna u prirodi, odnosno može se pronaći na različitim staništima poput otpadne i pitke vode, površinske vode, tla, industrijskih ispusta te vegetacije. Okolišni su izolati *K. pneumoniae* vrlo srodni kliničkim izolatima. Razlikuju se samo u određenim fenotipskim obilježjima. Prisustvo ove bakterije u prirodi te njena sposobnost izazivanja infekcije čine objašnjenje širokog kliničkog značenja ove bakterijske vrste.

## 6. Literatura


Andrašević, Š., Vranić-Ladavac, M., Tambić-Andrašević, A. 2009. Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. Infektološki glasnik, 654, 171-176.

Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Božić Luburić, Đ., Varga, I., Terzić, S. 2018. Kolistin, polipeptidni antibiotik zadnje obrane protiv invazivnih Gram-negativnih bakterija. Veterinarska stanica, 49, 273-286.

Bilić, B. 2015. Kolistin: stari lijek za liječenje novih multiplorezistentnih bakterija. Infektološki glasnik, 778, 117-127.

Brenner J., Don, Krieg R., Noel, Staley T., James. 2015. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer. Njemačka.

Bubonja-Šonje, M., Abram, M. 2014. Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. Medicina fluminensis, 50, 128-149.

Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetii M., V., Piazza, A., Bitar, I., De Cicco, M., Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., Pagani, L. 2017. Occurrence of Extended Spectrum β-Lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2.-Producing *Enterobacteriaceae* from Wells, River Water, and Wastewater Treatment Plants in Oltrepò Pavese Area, Northern Italy. Frontiers in Microbiology, 8, 2232.

Dobrijević, D., Trudić, A., Borčić, V., Bekut, M. 2017. Osetljivost sojeva *Klebsiella pneumoniae* izolovanih iz vode za piće i površinskih voda na antibiotike. Racionalna terapija, 1, 1-13.

Duvančić, T. 2019. Mehanizmi rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*. Diplomski rad, PMF, Zagreb.

Djurdjević, I. 2014. Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*. Završni rad, PTFOS, Osijek.

Erdeljić, V. 2012. Utjecaj primjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (AmpC i ESBL) i ishod liječenja bolesnika. Doktorska disertacija, MEF, Zagreb.

EUCAST / European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (2015.): Breakpoint tables of interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0.2015. http://www.eucast.org/

Farmacia. 2019. <https://www.farmacia.hr/farmacia-savjetuje/clanci/57/sve-o-antibioticima/>

Jelić, M., Hrenović, J., Dekić, S., Goić-Barišić, I., Tambić Andrašević, A. 2019. First evidence of KPC-producing ST258 Klebsiella pneumoniae in river water. Zagreb. Journal of Hospital Infection, https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.04.001

Kalenić, S., Bedenić, B., Bošnjak, Z. 2013. Medicinska mikrobiologija. Impresum, Zagreb.

Štimac, I., Vasiljev Marchesi, V., Tomljenović, M., Rukavina, T. 2009. Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima vode. Hrvatske vode, 18, 13-18.

Tešović, G. 2017. Primjena starih antibiotika u liječenju multirezistentnih bakterija u pedijatriji. Zagreb. Paediatria Croatia., 61, 212-219.

## 7. Sažetak

Bakterija *Klebsiella pneumoniae* nepokretna je gram-negativna štapićasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Smatra se patogenom koji uzrokuje niz ljudskih i životinjskih infekcija. Velika se pozornost pridaje njenoj otpornosti prema antibioticima. Primarno je otporna na ampicilin te karbenicilin, dok u bolnicama lako stječe rezistentnost na velik broj antibiotika koji se primjenjuju u liječenju raznih bolesti. U posljednjih se dvadesetak godina javlja sve veći broj sojeva *K. pneumoniae* rezistentnih na beta-laktamske antibiotike, a rezistencija je posredovana produkcijom beta-laktamaza proširenog spektra. Bakterija pokazuje stečenu rezistenciju na antibiotike te posjeduje sposobnost stjecanja i prenošenja gena za rezistenciju. Njeni okolišni izolati predstavljaju izvor tih gena koji se mogu prenijeti i na druge bakterijske vrste.

## 8. Summary

*Klebsiella pneumoniae* is a non-motile Gram-negative bacterium of the family *Enterobacteriaceae*. It is considered a pathogen which causes a variety of human and animal infections. Much attention is paid to its resistance to antibiotics. It is primarily resistant to ampicillin and carbenicillin, while in hospitals it is easy to acquire resistance to a large number of antibiotics used in the treatment of various diseases. In the last twenty years, an increasing number of strains of *K. pneumoniae* resistant to beta-lactam antibiotics has been reported, and resistance has been mediated by production of extended-spectrum beta-lactamases. The bacterium shows acquired resistance to antibiotics and possesses the ability to acquire and transmit resistance genes. Its environmental isolates are source of these genes that can be transmitted to other bacterial species.