

Ekspresija i primarna struktura gena ompK35 i ompK36 u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae* (ST437) neosjetljivih na ertapenem

Pejković, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:304802>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Mia Pejković

**Ekspresija i primarna struktura gena *ompK35* i
ompK36 u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*
(ST437) neosjetljivih na ertapenem**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Mia Pejković

**Expression and primary structure of *ompK35* and
ompK36 genes of *Klebsiella pneumoniae* (ST437)
clinical isolates non-susceptible to ertapenem**

GRADUATION THESIS

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, pod vodstvom prof. dr. sc. Arjane Tambić Andrašević. Diplomski rad je predan na ocjenjivanje Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovni-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ekspresija i primarna struktura gena *ompK35* i *ompK36* u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae* (ST437) neosjetljivih na ertapenem

Mia Pejković

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Karbapenemi su antibiotici zadnje linije obrane u liječenju infekcija izazvanih višestruko otpornim enterobakterijama otpornim na cefalosporine proširenog spektra, među kojima značajnu ulogu ima *Klebsiella pneumoniae*. Otpornost na karbapeneme postao je globalni zdravstveni problem. Proizvodnja karbapenemaza je najefikasniji mehanizam otpornosti na karbapeneme, no mehanizmi otpornosti na ovu klasu antibiotika, poglavito ertapenem, uključuju i hidrolizu ESBL enzimima u uvjetima smanjene koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici, proizašlih iz promjena u porinskim kanalima. OmpK35 i OmpK36 su hidrofilni porinski kanali *K. pneumoniae* koji omogućavaju unos nutrijenata i antibiotika u bakteriju. U ovom radu analizirane su promjene unutar gena *ompK35* i *ompK36* u kliničkih izolata *K. pneumoniae* ST437 smanjene osjetljivosti na ertapenem prikupljenih tijekom 2011./2012. godine u zagrebačkim bolnicama. Mehanizmi otpornosti su utvrđeni korištenjem metode lančane reakcije polimerazom, elektroforezom u agaroznom gelu i sekvenciranjem. Otpornost na ertapenem se utvrdila mjerenjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC, mg/L) metodom mikrodilucije u kation-prilagođenom Muller-Hinton bujonu. Svi izolati su pokazali visoku stopu otpornosti na ertapenem i imali su značajno sniženu ekspresiju OmpK35 porinskog kanala ($p < 0.001$). 47.8% izolata je imalo inserciju GD unutar L3 omče koja je povezana s pojačanom otpornosti na ertapenem. Svi izolati su imali promjene unutar gena *ompK36* (insercije, delecije, supstitucije).

(stranica teksta 48, slika 9, tablica 9, literaturnih izvora 40, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Klebsiella pneumoniae*, beta-laktami, ertapenem, MDR, otpornost, *ompK35* i *ompK36*

Voditelj: Dr. sc. Arjana Tambić Andrašević, red. prof.

Suvoditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Ocjenjivači: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Dr. sc. Renata Šoštarić, red. prof.

Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Rad prihvaćen: 19.2.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Expression and primary structure of *ompK35* and *ompK36* genes of *Klebsiella pneumoniae* (ST437) clinical isolates non-susceptible to ertapenem

Mia Pejković

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Carbapenems are last line antibiotics that are used as a treatment of infections caused by Enterobacteriaceae non-susceptible to extended spectrum cephalosporins, with *Klebsiella pneumoniae* as one of the most significant members of this family. Carbapenem resistance is major global health problem. Production of carbapenemases is the most efficient mechanism of carbapenem resistance, although mechanisms involved in carbapenem resistance involve ESBL enzymes that are able to hydrolyze this class of antibiotics in the presence of decreased concentration of antibiotics as a consequence of alternations of porins. *Klebsiella pneumoniae* hydrophilic porins OmpK35 and OmpK36 play role in intake of nutrients and antibiotics in bacterial cell. In this thesis structural alternations were analysed in *ompK35* and *ompK36* genes in clinical isolates of *K. pneumoniae* ST437. Isolates were collected during 2011/2012 in hospitals in Zagreb. Resistance mechanisms were determined by using polymerase chain reaction, agarose gel-electrophoresis and sequencing. Minimal inhibitory concentrations (MIC, mg/L) were measured by microdilution method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth. All isolates showed high level of ertapenem resistance and significantly lower level of expression of gene *ompK35* ($p < 0.001$). 47.8% isolates had GD insertions in loop L3, previously shown to affect high level ertapenem resistance. Clinical isolates had alterations in *ompK36* gene (insertions, deletions, substitutions).

(pages 48, figures 9, tables 9, references 40, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, beta-lactams, ertapenem, MDR, resistance, *ompK35* and *ompK36*

Supervisor: Dr.sc. Arjana Tambić Andrašević, Prof.

Co-supervisor: Dr.sc. Jasna Hrenović, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Jasna Hrenović, Prof.

Dr. sc. Renata Šoštarić, Prof.

Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, Doc.

Thesis accepted: 19.2.2020.

1. UVOD	1
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.2. Beta-laktamski antibiotici	3
1.2.1. Ertapenem	5
1.3. MEHANIZMI OTPORNOSTI NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE	7
1.3.1. Mehanizmi otpornosti uvjetovani proizvodnjom enzima beta-laktamaza	7
1.3.1.1. Beta laktamaze proširenog spektra- ESBL	9
1.3.2. Mehanizmi otpornosti koji nisu uvjetovani proizvodnjom beta-laktamaza	11
1.4. Porinski kanali	11
1.5. Cilj istraživanja	13
2. MATERIJALI I METODE	14
2.1. Popis materijala	14
2.1.1. Kemikalije i reagensi	14
2.1.2. Hranjive podloge i mediji	14
2.1.3. Boje	15
2.1.4. Standardi molekulskih masa	15
2.1.5. Enzimi, proteini i reakcijski puferi	15
2.1.6. Nukleinske kiseline	15
2.1.7. Puferi i otopine	15
2.1.8. Potrošni materijal	16
2.1.9. Uredaji	16
2.2. METODE	18
2.2.1. Bakterijski izolati	18
2.2.2. Mjerenje minimalnih inhibitornih koncentracija ertapenema kod <i>K. pneumoniae</i>	19
2.2.3. Detekcija i karakterizacija gena za otpornost na antibiotike	19
2.2.3.1. Izolacija ukupne bakterijske DNA	19
2.2.3.2. Lančana reakcija polimerazom	20
2.2.3.3. Određivanje slijeda nukleotida	21
2.2.4. Mjerenje ekspresije gena koji kodiraju za porinske kanale	24
2.2.4.1. Izolacija ukupne bakterijske RNA	24
2.2.4.2. Obrnuto prepisivanje RNA (reverzna transkripcija)	25
2.2.4.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	26
2.2.5. Statistička analiza	27
3. REZULTATI	28

3.1. Mjerenje minimalnih inhibitornih koncentracija ertapenema kod <i>K. pneumoniae</i>	28
3.2. Detekcija i karakterizacija gena za porinske kanale Ompk35 i Ompk36	32
4.RASPRAVA	39
5.ZAKLJUČCI	43
4. LITERATURA	44
5. ŽIVOTOPIS.....	48

POPIS KRATICA

ATCC - engl. American Type Culture Collection

cDNA - komplementarna jednolančana DNA (engl. complementary DNA)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

DHP-I - dehidropeptidaza I (engl. dehydropeptidase I)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

ESBL - β -laktamaze proširenog spektra (engl. extended spectrum beta-lactamases)

ExoI - egzonukelaza I (engl. exonuclease I)

GlcNAc - N-acetilglukozamina (engl. N-acetylglucosamine)

KPC - engl. *K.pneumoniae* carbapenemase

LB - hranjivi medij Luria Bertani

MH - hranjivi medij Mueller Hinton

MBL - metalo- β -laktamaze

MDR - višestruko otporni (engl. multi-drug resistant)

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija (engl. minimaln inhibitory concentration)

MurNAc - N-acetilmuraminske kiseline (engl. N-acetylmuramic acid)

PBP – protein koji veže penicilin (engl. penicillin-binding protein)

PC KPC - KPC pozitivna kontrola (engl. positive control KPC)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)

SaP - alkalna fosfataza škampa (engl. shrimp alkaline phosphatase)

qRT-PCR - kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. quantitative real-time PCR)

1. UVOD

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je gram-negativna bakterija iz porodice Enterobacteriaceae prvi put opisana 1882. godine iz izolata pluća pacijenta. Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća i bakterije poput *Escherichia coli*, vrste roda *Yersinia*, *Shigella* i *Salmonella* (Martin i Bachman, 2018.). Bakterije koje posjeduju mehanizme otpornosti na antibiotike i najčešće uzrokuju teške bolničke infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata spadaju u skupinu ESKAPE patogena. ESKAPE skupinu sačinjavaju gram-pozitivne i gram-negativne bakterije kao što su *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i vrste roda *Enterobacter*. *Klebsiella pneumoniae* je uz *E. coli* drugi najzastupljeniji gram-negativni uzročnik bolničkih bakterijemija. Bakterije roda *Klebsiella* su široko rasprostranjene, prisutne su u kanalizacijskim i površinskim vodama, na tlu i biljkama, dok se u ljudskom tijelu u normalnim uvjetima mogu pronaći na površini sluznice ždrijela i probavnog sustava kao saprofiti. Zbog nepovoljnih uvjeta za rast rijetko su prisutne na površini ljudske kože, osim tijekom prijelaza na pogodnija staništa (Podschun i Ullmann, 1998.; Martin i Bachman, 2018.). *K. pneumoniae* na agaru ima sluzavi fenotip koji nastaje zbog polisaharidne kapsule na vanjskoj membrani bakterije i fermentacije laktoze. Okolišna *K. pneumoniae* se razlikuje od kliničke prema tipu kapsule, te je zbog odsustva selektivnog pritiska osjetljivija na djelovanje antibiotika (Martin i Bachman, 2018.).

Sržni genom je genom sačuvan i prisutan unutar svih jedinki pojedine vrste bakterije, te u *K. pneumoniae* ima približno 2000 gena. Dodatni genom sačinjen je od gena koji nisu konzervirani i razlikuju se između jedinki iste vrste, mogu se nalaziti na kromosomima bakterije ili na plazmidima. Većina genoma bakterije *K. pneumoniae* pripada dodatnom genomu, otprilike 3000-4000 gena koji kodiraju enzime potrebne za procese poput fiksacije dušika, otpornost na antibiotike i faktore virulencije. Dodatni geni prenose se između bakterijskih vrsta pokretnim genetičkim elementima i preko genomskih otoka (Martin i Bachman, 2018.).

Proporcionalno s duljinom boravka pacijenta u bolnici i upotrebom antibiotika se povećava kolonizacijska stopa *K. pneumoniae*. Kolonizacijska stopa je broj bakterijskih kolonija prisutnih na određenoj površini i razlikuje se ovisno o tome je li infekcija s *K. pneumoniae* bolnička ili vanbolnička (Martin i Bachman, 2018.). Stjecanje i učestali horizontalni prijenos gena otpornosti među bakterijskim vrstama porodice *Enterobacteriaceae* dovode do pojave višestruko rezistentnih bakterija. Osim lakog prijenosa plazmida s rezistentim genima, široka i nepažljiva upotreba antibiotika, te širenje genetičkih linija visokog rizika omogućilo je sve veću prevalenciju MDR (engl. multi-drug resistant) sojeva *K. pneumoniae*, te

infekcije uzrokovane MDR sojevima imaju veliku stopu smrtnosti jer su opcije za liječenje ovakvih infekcija ograničene. MDR sojevi rezistentni su na četiri važne klase antibiotika koji obuhvaćaju aminoglikozide, florokinolone, karbapeneme i treću generaciju cefalosporina. Najčešći način prijenosa *K. pneumoniae* u bolnicama je kontakt između pacijenata i zdravstvenih radnika (čije ruke mogu biti izvor ove bakterije), zagađenih površina i instrumenata. Rod *Klebsiella* uzrokuje infekcije mokraćnog sustava, dišnog sustava i infekcije krvotoka. Neke od infekcija uzrokovanih *K. pneumoniae* su cistitis, upale pluća, infekcije rana poslije operacije, septikemija i endokarditis (Navon-Venezia i sur., 2017.; Podschun i Ullmann, 1998.). Tumor predstavlja dobru predispoziciju za razvoj bolničkih infekcija krvotoka uzrokovanih s *K. pneumoniae*, dok su bolesti jetre i dijabetes povezani s vanbolničkim infekcijama uzrokovanim ovom bakterijom. Infekcije uzrokovane s *K. pneumoniae* u najvećem postotku zahvaćaju mokraćni sustav, pretpostavlja se da to nastaje kao posljedica prelaska bakterija iz probavnog u mokraćni sustav preko perineuma. Infekcija krvotoka pojavljuje se većinom kao sekundarna infekcija uzrokovana širenjem iz primarnog izvora kao što su mokraćni sustav, probavni sustav, dišni sustav, kao posljedica primjene intravenskih i mokraćnih katetera, itd. Smrtnost zbog infekcija krvotoka uzrokovanih s *K. pneumoniae* iznosi 20-30% (Martin i Bachman, 2018.).

Klonovi visokog rizika imaju globalnu rasprostranjenost i pojačanu mogućnost kolonizacije, širenja i zauzimanja velikog broja niša. Uz otpornost na antibiotike ovi klonovi su stekli dodatne karakteristike koje im povećavaju stopu patogenosti i preživljavanja. Klonovi visokog rizika brzo i efikasno prenose genetičke elemente (npr. gene, integrone, transpozone, plazmide) između različitih bakterijskih vrsta i stoga imaju važnu ulogu u globalnom širenju otpornosti. Gen *bla_{KPC}* širi se pretežno zbog izolata koji su dio klonalne grupe 258 (Pitout i sur., 2015.). Sekvencijski tip (ST) 437 je varijant klona ST258 u jednom lokusu. ST437 ima alelski profil 3-3-1-1-1-1-31, dok ST258 ima alelski profil 3-3-1-1-1-1-79. Klon ST437, s obzirom na genetsku povezanost sa klonom ST258, predstavlja ozbiljan potencijal za nastanak epidemija (Seki i sur., 2011.).

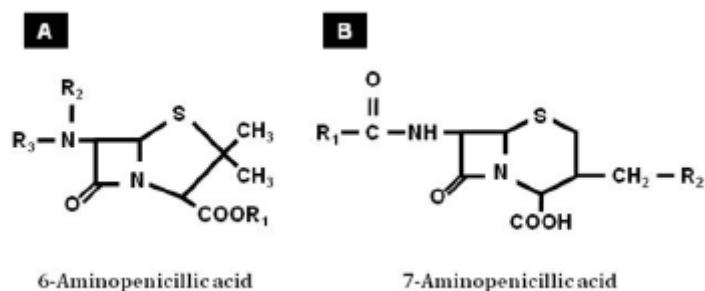
1.2. Beta-laktamski antibiotici

Beta-laktami su skupina antibiotika, od kojih je prvi otkriven penicilin 1928. godine. Beta-laktamski antibiotici imaju sličnu građu, odnosno u njihovom središtu se nalazi četveročlani beta-laktamski prsten. Kod svih beta-laktama, osim kod monobaktama, beta-laktamski prsten je dio bicikličke strukture. Beta-laktami najčešće upotrebljavani antibiotici i dijele se na peniciline, cefalosporine, monobaktame (aztreonam) i karbapeneme. Beta-laktami se preko porinskih kanala unose u gram-negativne bakterije. Ulaskom u stanicu ovi antibiotici ometaju sintezu peptidoglikanskog sloja bakterijske stanične stijenke koji je bakteriji važan za integritet stanice i preživljavanje bakterije. Peptidoglikani su molekule od približno jednakog omjera šećera i proteinskih komponenti. Peptidoglikani gram-pozitivnih bakterija su građeni od N-acetilglukozamina (engl. N-acetylglucosamine, GlcNAc) i N-acetilmuraminske kiseline (engl. N-acetylmuramic acid, MurNAc), te tetrapeptida građenog od aminokiselina D-alanin, L-alanin, D-glutaminske kiseline i diaminopimelinske kiseline. Beta-laktami inhibiraju zadnji korak u sintezi peptidoglikana acetiliranjem transpeptidaze koja umrežava peptidne podjedinice peptidoglikana bakterijske stanične stijenke. Transpeptidaze na koje djeluju beta-laktamski antibiotici se nazivaju proteini koji vežu penicilin (engl. penicillin-binding protein, PBP). Naime, beta-laktam je po svojoj strukturi analog alanil-alaninu. Alanil-alanin je sastavni dio MurNAc koja stvara poprečne veze između peptidnih lanaca u peptidoglikanskom sloju. Bakterijske stanice ne mogu više održavati osmotski gradijent zbog poremećene sinteze peptidoglikanskog sloja i potiče se autolitički proces u bakterijskoj stanici, odnosno bubre i pucaju. Obzirom da bakterijska stanica samo u fazi dijeljenja stvara novu staničnu stijenku tj. peptidoglikanski sloj, beta-laktamski antibiotici stoga djeluju samo na stanice u dijeljenju (Kong i sur., 2010.).

Penicilin je ciklički dipeptid građen od L-cisteina i D-valina. Konformacija na krajevima molekula penicilina je slična konformaciji okosnice D-alanil-D-alanina. Izrazito reaktivna CO-N veza unutar beta-laktamskog prstena penicilina je smještena na istom mjestu kao CO-N veza kod D-alanil-D-alanina, odnosno na mjestu gdje se odvija transpeptidacija. Iz svega proizlazi da se penicilin, kao i većina beta-laktama, ponaša kao analog supstrata i veže se kovalentno na transpeptidazu na mjesto gdje se obično veže D-alanil-D-alanin (Kong i sur., 2010.).

Prvi beta-laktami, penicilini, su imali penicilinsku jezgru od 6-aminopenicilinske kiseline (6-APA) i dodavanjem postraničnih lanaca na 6-APA razvijeni su novi polusintetički beta-laktami. Izolacijom supstance cefalosporin C iz *Cephalosporium acremonium* (*Sarcocladium strictum*) počeo je razvoj novih antibiotika iz skupine beta-laktama koji su u jezgri imali 7-aminocefalosporinsku kiselinu (7-ACA) umjesto 6-APA (Slika 1.). Monobaktami i penemi

imaju jezgru drugačiju od 6-APA i 7-ACA, te imaju širi spektar djelovanja od prethodno opisanih beta-laktama (Kong i sur., 2010.).



Slika 1. Prikaz strukturne okosnice penicilina, 6-APA, i cefalosporina, 7-APA (Preuzeto i prilagođeno iz Kong i sur., 2010.)

Pencilini imaju jezgru od prstena 6-aminopenicilične kiseline (laktam i tiazolidin) i dodatne grupe vezane na prsten. Cefalosporini imaju 7-aminocefalosporinsku kiselinu u jezgri, te postranične dodatne prstenove 3,6-dihidro-2 H-1,3-tiazan. Baš kao i penicilini, cefalosporini imaju baktericidno djelovanje. Cefalosporini su podijeljeni u pet generacija. Nedugo nakon uvođenja terapija cefalosporinima treće generacije su se pojavile gram-negativne bakterije koje su sintetizirale izmjenjene beta-laktamaze zbog kojih su postale otporne na cefalosporine treće generacije i monobaktam aztreonam. Monobaktami su beta-laktami kod kojih beta-laktamski prsten nije fuzioniran s nikakvim dodatcima (Neelanjana i Cascella, 2019.).

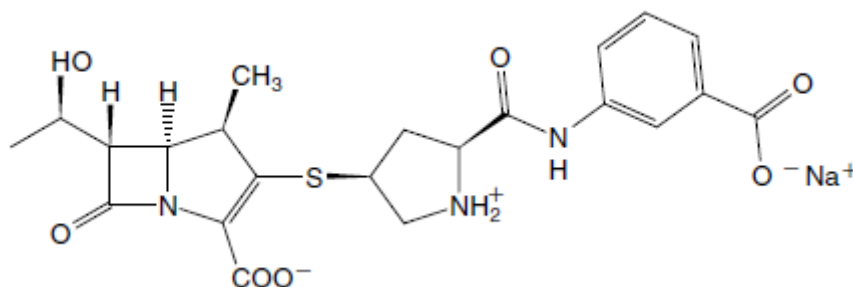
Karbapenemi imaju strukturu sličnu ostalim beta-laktamskim antibioticima, međutim u sekundarnom prstenu im je atom sumpora zamijenjen ugljikom na poziciji 1 i postranični lanac hidroksietila je vezan na poziciji 6, te između pozicije C5 i C6 je veza u beta-laktamskom prstenu u *trans* konfiguraciji. Također karbapenemi imaju nezasićene veze između ugljikovih atoma na pozicijama 2 i 3 i sve navedeno ih čini otpornima na hidrolizu većinom beta-laktamaza. Karbapenemi se primjenjuju intravenozno. U novije vrijeme su bakterije, naročito gram-negativne bakterije, počele sintetizirati beta-laktamaze koje mogu hidrolizirati karbapeneme, te su stoga dobile naziv karbapenemaze (Neelanjana i Cascella, 2019.). Ljudski enzim dehidropeptidaze I (engl. dehydropeptidase I, DHP-I) bubrega hidrolizira karbapeneme kao što je imipenem. Takvim karbapenemima je za aktivnost potrebna prisutnost inhibitora DHP-I. Noviji karbapenemi, kao što je ertapenem, meropenem, su stabilniji u prisustvu DHP-I i stoga ne zahtijevaju prisustvo inhibitora DHP-I za svoju aktivnost (Curran i sur., 2003.). Neki od karbapenema su imipenem/cilastatin, meropenem, doripenem i ertapenem (Neelanjana i Cascella, 2019.).

1.2.1. Ertapenem

Ertapenem (Slika 2.) je karbapenemski antibiotik proširenog spektra koji pokazuje efikasno antibakterijsko djelovanje kod gram-negativnih, gram-pozitivnih bakterija, te anaerobnih bakterija. Ertapenem se počeo upotrebljavati 2001. godine i poput ostalih beta-laktama se veže na PBP i inhibira sintezu bakterijske stanične stijenke (Curran i sur., 2003.).

Produkt metaboliziranja ertapenema je veliki, otvoreni derivat beta-laktamskog prstena koji nastaje nakon hidrolize. Ertapenem se iz organizma uklanja prvenstveno preko bubrega. Selektivna toksičnost ertapenema uočljiva je u tome što kao i svi beta-laktamski antibiotici djeluje na peptidoglikanski sloj bakterija koji nije prisutan u stanicama ljudskog tijela, stoga uništava samo bakterijske stanice. Kao kod većine beta-laktamskih antibiotika najučestalije nuspojave pri upotrebi ertapenema su proljev, mučnina i povraćanje (Woodford i sur., 2006.).

Ertapenem je otporan na hidrolizu velikog broja bakterijskih beta-laktamaza. Mehanizmi otpornosti na ertapenem uključuju promjene u PBP, proizvodnju beta-laktamaza, promijenjenu propusnost membrane koja onemogućava ulazak lijekova do ciljnih mjesta, veću koncentraciju pumpi za izbacivanje koje sprečavaju nakupljanje lijekova na ciljnim mjestima (Curran i sur., 2003.). Iako je proizvodnja karbapenem-hidrolizirajućih beta-laktamaza (karbapenemaza) postala najznačajniji mehanizam otpornosti na karbapeneme, otpornost na antibiotik ertapenem se kod *K. pneumoniae* javlja kao kombinacija mutacija unutar porinskih kanala, OmpK35 i OmpK36, vanjske membrane i povećane proizvodnje enzima AmpC i beta-laktamaza proširenog spektra (engl. extended spectrum beta-lactamases, ESBL), odnosno ova otpornost ne ukazuje nužno na proizvodnju karbapenemaza (Martin i Bachman, 2018.). Dokazano je da uvođenjem nekih ESBL gena (SHV i CTX-M) i beta-laktamaza (OXA-2) preko plazmida kod sojeva *K. pneumoniae* osjetljivih na ertapenem ti sojevi postaju rezistentni na ertapenem (Leavitt i sur., 2009.).



Slika 2. Strukturni prikaz molekule ertapenema (preuzeto i prilagođeno iz Curran i sur., 2003.)

Kod sojeva koji postanu rezistentni na ertapenem prilikom terapije ertapenemom se u daljnjem liječenju koriste karbapenemi iz 2. skupine, kao što su imipenem i meropenem, koji

su umjereno aktivni u borbi protiv bakterija. Karbapenemi 2. skupine ostaju aktivni zbog mogućnosti ulaska u bakterijsku stanicu kroz manje porinske kanale, te zbog manje stope izbacivanja iz stanice pomoću pumpi za izbacivanje ili zbog sporijeg hidroliziranja od strane AmpC i ESBL enzima (Woodford i sur., 2006.).

1.3. MEHANIZMI OTPORNOSTI NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE

Otpornost na beta-laktame je u rijetkim slučajevima kod kliničkih izolata intrizična, ona se većinom stječe mutacijama ili horizontalnim prijenosom gena. Mehanizmi otpornosti na antibiotike uključuju promjene ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, inaktivaciju antibiotika bakterijskim enzimima, promjene u propusnosti vanjske membrane i pojačano izbacivanje antibiotika iz bakterijske stanice zbog pojačane ekspresije pumpa za izbacivanje. Bakterije mogu posjedovati više mehanizama otpornosti na antibiotike što ih čini višestruko otpornim (Meletis, 2016.).

1.3.1. Mehanizmi otpornosti uvjetovani proizvodnjom enzima beta-laktamaza

Najučinkovitiji i najrašireniji mehanizam otpornosti na beta-laktame, te ujedno i karbapeneme je proizvodnja enzima beta-laktamaza. Beta-laktamaze su enzimi koji hidroliziraju amidnu vezu beta-laktamskog prstena i tako inaktiviraju antibiotik. Na temelju analize sekvenci PBP-a i beta-laktamaza smatra se da ovi enzimi potječu od zajedničkog pretka. Do danas je opisano i identificirano preko 300 enzima koji spadaju u skupinu beta-laktamaza. Većina beta-laktamaza je kodirana dodatnim genomom, npr. plazmidima, jer se otpornosti razvijaju kao posljedica selektivnog pritiska, te zbog lakog prijenosa predstavljaju veliku opasnost za zdravlje. Prema molekularnoj strukturi enzima, na temelju nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci, beta-laktamaze se mogu podijeliti u četiri klase (A-D). Klase A, C i D u aktivnom mjestu imaju serin, dok klasa B beta-laktamaza ima cink u aktivnom mjestu (Hirsch i Tam, 2010.; Kong i sur., 2010.).

Beta-laktamaze Amblerove klase A su prvenstveno opisane u gram-pozitivnih bakterija, potom su pronađene i kod gram-negativnih bakterija. Enzimi klase A mogu biti kodirani plazmidima, transpozonomima ili kromosomima i imaju najveću stopu varijabilnosti unutar sekvenci. Nazivaju se još i penicilaze, a neke od njih su VHS, PER, TEM i SHV. KPC (engl. *K. pneumoniae* carbapenemase) tip karbapenemaza kod *K. pneumoniae* je najvažniji tip kliničkih karbapenemaza. Karbapenemaze klase A se uspješno inhibiraju klavulanskom kiselinom (Martin i Bachman, 2018.). *K. pneumoniae* koja je sintetizirala KPC prvi put izolirana je 1996. godine u Sjevernoj Karolini, SAD (Kitchel i sur., 2010.; Nordmann i sur., 2009.). KPC enzimi su učinkoviti u hidroliziranju proširenog spektra beta-laktamskih antibiotika, uključujući penicilin, aztreonam (monobaktam), karbapeneme, te cefalosporine stare i nove generacije. Svi dosada pronađeni *bla_{KPC}* kod *K. pneumoniae* se većinom prenose plazmidima sa dijelovima transpozona Tn4401 povezanog s Tn3 (Tzouveleki i sur., 2012.). Tn4401 element sadrži uz gen *bla_{KPC}* gene za rezolvazu, transpozazu i dvije insercijske

sekvenca ISK $pn6$ i ISK $pn7$ (Lee i sur., 2016.). Osim kod *K. pneumoniae* KPC enzimi su još izolirani iz drugih vrsta porodice Enterobacteriaceae, te vrsta *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (Kitchel i sur., 2010.). Za razliku od nekih ESBL enzima koji hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra, KPC enzimi ih također hidroliziraju, ali nisu u potpunosti inhibirani klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. KPC enzimi smanjuju osjetljivost na karbapeneme, dok su im za potpunu otpornost potrebni dodatni mehanizmi kao promjene u propusnosti vanjske membrane. Plazmidi koji nose gen *bla_{KPC}* obično nose i gene za otpornost na aminoglikozide, i povezuju se s drugim genima za beta-laktamaze poput najraširenijeg ESBL gena *bla_{CTM-X-15}* (Nordmann i sur., 2009.). KPC sojevi su osjetljivi na kolistin, aminoglikozide i tigeciklin (Lee i sur., 2016.).

Amblerovu klasu B beta-laktamaza čine metalo-beta-laktamaze (MBL) kojima je potreban Zn²⁺ u aktivnom mjestu kako bi bile djelotvorne i dijele se na New Delhi metalo-beta-laktamaze-1 (NDM-1), Verona-integronom kodirane metalo-beta-laktamaze (VIM) i imipenemaze (IMP). Aktivnost MBL enzima inhibirana je djelovanjem EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). MBL enzimi su povezani s putovanjima i hospitalizacijom u endemičnim regijama poput Indije. VIM i IMP enzimi se prenose preko integrona i mogu se ugraditi u bakterijski kromosom ili mogu ostati na plazmidima (Martin i Bachman, 2018.). MBL enzimi mogu hidrolizirati skoro sve karbapeneme, izuzev monobaktama. Divalentni kationima (Zn²⁺) nukelofilno napadaju beta-laktamski prsten. Ovi enzimi su aktivni protiv penicilina, karbapenema i cefalosporina, ali ne mogu inaktivirati aztreonam. *bla_{VIM}* i *bla_{IMP}* su kod *K. pneumoniae* pronađeni kao genske kazete ugrađene u varijabilnu regiju integrona razreda 1. Geni *bla_{NDM}* nisu povezani s integronima. Među jedinkama koje kodiraju VIM enzime su pronađeni ESBL sojevi koji tako šire spektar otpornosti i na aztreonam (monobaktam) (Tzouvelekis i sur., 2012.). Klinički su najznačajnije NDM metalo-beta-laktamaze. Enzimi skupine MBL su osjetljivi na aztreonam (Lee i sur., 2016.).

Beta-laktamaze Amblerove klase C uspješno hidroliziraju cefalosporine, stoga se još nazivaju i cefalosporinaze, te su većinom kromosomski kodirane. Karbapenemaze ove klasu nisu učestale i klinički značajne kod vrste *K. pneumoniae*, te se ne smatraju „pravim“ karbapenemazama. Klasa C karbapenemaza ima slabu mogućnost hidrolize karbapenema, ali ako dođe do pojačane ekspresije karbapenemaza u kombinaciji s promjenjenom propusnošću vanjske membrane ili povećanom ekspresijom pumpa za izbacivanje može doći do stjecanja rezistentnosti na iste (Martin i Bachman, 2018.).

Amblerovu klasu D čine plazmidom kodirani enzimi oksicilinaze koje razgrađuju izoksazoil beta-laktame poput kloksacilina ili oksacilina. Jedan takav enzim kod *K. pneumoniae*

je OXA-48 koji omogućava jaku otpornost na imipenem (Martin i Bachman, 2018.). OXA-48 hidrolizira antibiotike tako da rotira alfa-hidroksietilnu grupu karbapenema unutar aktivnog mjesta i omogućava gibanje deacilirane vode prema aciliranim ostatcima serina. Enzimi OXA uspješno hidroliziraju peniciline, karbapeneme i stariju generaciju cefalosporina, dok su neučinkoviti protiv oksiiimino cefalosporina. Sekvence gena *bla_{OXA-48}* koji se prenose na plazmidu su usko povezane s IS1999, elementom iz IS4 obitelji koji ima ulogu u mobilizaciji i ekspresiji gena za otpornost na beta-laktame (Tzouveleki i sur., 2012.).

1.3.1.1. Beta laktamaze proširenog spektra- ESBL

Povećanom upotrebom antibiotika razvile su se ESBL koje su kodirane dodatnim genomom. Tijekom 1970.-ih i 1980.-ih *K. pneumoniae* posjedovala je plazmide koji posjeduju gene otpornost na aminoglikozide, poslije je stekla ESBL varijante gena TEM. Enzimi ESBL su im omogućili otpornost na cefalosporine proširenog spektra. Plazmidi koji su sadržavali gene koji kodiraju enzime ESBL nosili su često i gene za otpornost na lijekove koji nisu beta-laktami, npr. aminoglikozide, kloramfenikole, sulfoamide, tetraciklin, trimetoprim i gene za otpornost na teške metale. Enzimi ESBL hidroliziraju cefalosporine treće generacije i aztreonam, odnosno oksiiimino-cefalosporine, inhibiraju se dodatkom klavulanske kiseline. Konstantno stjecanje gena za otpornost na aminoglikozide i ESBL, uz brzo nakupljanje kromosomskih mutacija dovelo je do otpornosti na kinolone. Karbapenemi su donedavno bili jako učinkoviti u borbi protiv ESBL enzima jer ostaju stabilni unatoč njihovom djelovanju i zbog male veličine karbapenema lako prodiru kroz porinske kanale u gram-negativne bakterije. Na primjeru ESBL sojeva *K. pneumoniae* se lako uočava brzo stjecanje novih otpornosti koje omogućavaju bakterijama preživljavanje u nepogodnim uvjetima. Oko 2000.godine, nakon upotrebe karbapenema kao jedine opcije u suzbijanju infekcija uzrokovanih rezistentnim *K. pneumoniae*, pojavljuju se višestruko rezistentni sojevi. Zadnjih desetljeća su sve češće MDR *K. pneumoniae* koje spadaju u skupinu koju obilježava otpornost na cefalosporine proširenog spektra jer stvaraju ESBL enzime. MDR sojevi najčešće posjeduju gene koji kodiraju ESBL enzime i nalaze se na plazmidima koji nose gene koji kodiraju i druge otpornosti, npr. aminoglikozide, sulfoamide i kinolone. Uz gene koji kodiraju enzime otpornosti na karbapeneme na dodatnom genomu, moguće su i mutacije unutar sržnog genoma koje potpomažu te otpornosti (Martin i Bachman, 2018.). Pojačana ekspresija gena koji kodiraju pumpe za izbacivanje i/ili promjene u porinskim kanalima vanjske membrane su promjene koje se odvijaju unutar sržnog genoma bakterije *K. pneumoniae* i potpomažu otpornost na karbapeneme kao što su imipenem, meropenem i ertapenem. Prvi otkriveni enzimi ESBL razreda A bili su enzimi koji su se od

plazmidom posredovanih TEM-1/2 i SHV-1 penicilinaza razlikovali u 1-4 točkaste mutacije. TEM i SHV enzimi uspješno hidroliziraju ampicilin, amoksisicilin, ostale peniciline i cefalosporine prve, ali ne i treće generacije. Točkaste mutacije su ESBL enzimima nalik TEM i SHV još dodatno omogućile hidrolizu većeg broja antibiotika, kao što su cefalosporini treće generacije i aztreonam. Promjene uvjetovane dodatnim genomom koje doprinose razvoju otpornosti su pojačana proizvodnja enzima ESBL i AmpC enzima (Kitchel i sur., 2010.; Hirsch i Tam, 2010.; Podschun i Ullmann, 1998.). Stvaranje beta-laktamazama AmpC-tipa koje se prenose plazmidima je mehanizam koji bakterijama osigurava otpornost na imipenem, odnosno za razliku od ESBL enzima mogu hidrolizirati cefamicine i ne ihbira ih klavulanat i drugi inhibitori beta-laktamaza. Neki od ESBL enzima su TEM, SHV, VEB i CTM-X koji hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra (Nordmann i sur., 2009.; Paterson, 2006.).

CTM-X enzimi spadaju u Amblerovu klasu A beta-laktamaza proširenog spektra i prvi put izolirane su 1980-ih u Europi nedugo nakon početka upotrebe cefotaksima u liječenju bakterijskih infekcija (Wang i sur., 2013.). Podrijetlo CTX-M enzima razlikuje se od podrijetla TEM i SHV enzima, CTX-M enzimi nastali su od okolišnih bakterija *Kluyvera* spp. Na temelju aminokiselinskih sekvenci ovi enzimi dijele se u pet skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Obitelj CTX-M enzima sastoji se od 40-ak enzima. Za razliku od TEM i SHV cefotaksimaza CTX-M enzimi imaju slabiju hidrolitičku aktivnost naspram ceftazidima, no jako su efikasni u hidroliziranju cefepima i cefpiroma. CTX-M enzimi ne pokazuju hidrolitičku aktivnost prema cefoksitinu i imipenemu, za razliku od drugih ESBL enzima razreda A (Wang i sur., 2013.; Bonnet, 2004.; Yu i sur., 2002.). Puno ESBL sojeva nema OmpK35, što im pojačava na ceftazidim. Dodatni gubitak OmpK36 dovodi do smanjene osjetljivosti na cefotaksim, cefamicin i karbapeneme (Landman i sur., 2009.). Geni *bla_{CTX-M}* doprinose otpornosti na ertapenem čak kod bakterija koje nemaju karbapenemaze i netaknute su im sekvence gena *ompK* (Adler i sur., 2015.).

Kod *K. pneumoniae* najrasprostranjeniji je CTX-M-15 enzim koji spada u CTX-M-1 skupinu enzima. Geni koji kodiraju CTX-M enzime nalaze se na plazmidu koji je velik 7-160 kb. *K. pneumoniae* koje sintetiziraju CTX-M imaju otpornost na gentamicin, trimetoprim-sulfametoksazol, tetraciklin uz otpornosti na ciprofloksacin i piperacilin-tazobaktam (Wang i sur., 2013.; Bonnet, 2004.; Yu i sur., 2002.). 2000. godine zabilježena je prva epidemija prouzrokovana CTM-X sojem *K. pneumoniae* (Calbo i Garau, 2015.).

1.3.2. Mehanizmi otpornosti koji nisu uvjetovani proizvodnjom beta-laktamaza

Promjene u receptorskim molekulama za antibiotike

Bakterije mogu mijenjati ciljna mjesta na koje se vežu antibiotici i na taj način postići otpornost. Jedan od takvih primjera je i mutacija unutar gena koji kodiraju za PBP koji su usidreni na citoplazmatskoj membrani bakterijske stanične stijenke i imaju funkciju u kontroliranju slaganja stanične stijenke tijekom sinteze.

Smanjena koncentracija antibiotika u stanici

Ravnoteža između unosa antibiotika u stanicu i izbacivanja istog iz stanice određuje razinu osjetljivosti bakterije na određeni antibiotik. Manja koncentracija antibiotika u bakterijskoj stanici postiže se smanjenom ekspresijom porinskih kanala vanjske membrane koji omogućavaju unos antibiotika u stanicu i/ili povećanom ekspresijom efluks pumpi čime se omogućava efikasnije uklanjanje antibiotika iz bakterijske stanice.

Efluks pumpe doprinose višestrukim otpornostima jer imaju mogućnost izbacivanja širokog spektra antibiotika iz unutarstaničnih odjeljaka bakterije u okoliš, ili u slučaju gram-negativnih bakterija iz međumembranskih prostora u okoliš. Gram-negativne bakterije najčešće posjeduju pumpe RND (engl. resistance-nodulation-division) superporodice koje doprinose višestrukim otpornostima. Kod *K. pneumoniae* je najpoznatija efluks pumpa AcrAB-TolC. Ove pumpe izbacuju raznovrsne antibiotike, boje, žučne soli, deterdžente i biocide iz bakterija i često su kodirane genima na kromosomima (Santajit i Indrawattana, 2016.).

1.4. Porinski kanali

Stanična ovojnica gram-negativnih bakterija je građena od tri sloja: vanjska membrana, stanična stijenka građena od peptidoglikana i unutrašnja membrana. Vanjska membrana gram-negativnih bakterija stvara hidrofobnu barijeru koja sprječava unos teških metala ili deterdženata u bakterijsku stanicu. Kako bi bio moguć unos tvar potrebnih bakteriji za opstanak ove membrane imaju specifične proteine tzv. porinske kanale. Trimerni porinski kanali su ispunjeni vodom i omogućuju selektivni unos hidrofilnih molekula kao što su esencijalne tvari i nekih drugih supstanci, uključujući i antibiotike, služe kao receptori, iznose toksine iz stanice, ponašaju se kao faktori virulencije tijekom bakterijskih infekcija i imaju ulogu u održavanju strukture stanice (Tsai i sur., 2011.; Nordmann i sur., 2012.). Antibiotici su hidrofilne, nabijene molekule koje moraju doći u periplazmu bakterija da bi bile djelotvorne, a unose se iz okoliša u periplazmu preko porinskih kanala. Beta-laktami moraju doći do svojih ciljnih proteina, PBP, budući da su beta-laktami velike nabijene molekule prijenos odvija se preko hidrofilnih

porinskih kanala. Inaktivacija i uklanjanje antibiotika iz bakterijskih stanica odvija se pomoću beta-laktamaza u periplazmi ili pomoću pumpa za izbacivanje. Bakterija će biti rezistentnija ako je manji broj funkcionalnih porinskih kanala preko kojih će se antibiotik unositi u bakterijsku periplazmu, međutim s manjim brojem porinskih funkcionalnih kanala se može i manje nutrijenata unijeti u stanicu koji su bakteriji esencijalni za opstanak. Porinski kanali koji omogućavaju brz unos antibiotika u periplazmu mogu preopteretiti mehanizme otpornosti i tako umanjiti njihovu djelotvornost. Pri velikom prisustvu antibiotika razumljivo je da će opstati samo bakterije koje imaju promijenjene ili manji broj porinskih kanala (Sugwara i sur., 2016.; Tsai i sur., 2011.). Istraživanja pokazuju da je rezistentnost na karbapeneme kod izolata s promjenama u porinskim kanalima nije održiva iz razloga što takvi izolati zbog smanjene propusnosti vanjske membrane imaju problema s unosom tvari potrebnih za rast i tako im se smanjuje preživljavanje (Nordmann i sur., 2012.).

Klebsiella pneumoniae u vanjskoj membrani ima tri velika proteina, OmpK35, OmpK36 i OmpA (Tsai i sur., 2011.). OmpK35 i OmpK36 porinski kanali kod *K. pneumoniae* su homologni porinskim kanalima OmpF i OmpC kod *E. coli*. Gubitak funkcije jednog ili oba kanala doprinosi smanjenju osjetljivosti na antibiotike, ali negativno utječe na virulenciju i preživljavanje bakterija. Kod većine ESBL sojeva *K. pneumoniae* eksprimiran je samo OmpK36 porinski kanal, kod sojeva koji ne proizvode ESBL enzime većinom su prisutna oba porinska kanala. Nedostatak OmpK35 porina potpomaže razvoju otpornosti na antibiotike kao što su npr. cefalosporini, dok je nedostatak OmpK36 porina odgovoran za smanjenu osjetljivost ESBL sojeva *K. pneumoniae* na karbapeneme. Smatra se da gubitak OmpK35 ima jako malu ulogu u otpornosti bakterija ako se nalaze u mediju s visokom osmomolarnošću, a veću u medijima s niskom osmolarnošću, za gubitak OmpK36 vrijedi obrnuto. Tekućine u ljudskom tijelu imaju veću osmomolarnost i stoga gubitak OmpK36 ima veću ulogu u otpornosti kod *K. pneumoniae*. Gubitak porinskih kanala smanjuje osjetljivost ESBL sojeva i sojeva koji proizvode AmpC beta-laktamaze čak do 128 puta na cefalosporine, npr. cefepim. Gubitak porina ima veći utjecaj na otpornost na meropenem, nego na imipenem (Tsai i sur., 2011.).

Do gubitka porinskih kanala najčešće dolazi zbog: i) točkastih mutacija ili insercija unutar kodirajuće sekvence koje dovode do uranjene terminacije translacije, II) točkastih mutacija unutar promotora što djeluje na transkripciju, III) mehanizmi koji utječu na translaciju porinskih proteina ili sprječavaju insercije porinskih kanala u vanjsku membranu. Češće su insercije sekvenci u kodirajuće sekvence porinskih kanala koje dovode do inaktivacije porina, nego li točkaste mutacije. Velikom broju *K. pneumoniae* koje proizvode ESBL enzime nedostaju OmpK35 porinski kanali koji su odgovorni za ulazak ceftazidima u bakterijsku

stanicu preko vanjske membrane gram-negativnih bakterija (Doumith i sur., 2009.). Dosadašnja istraživanja su pronašla poveznicu između promjena unutar L3 omče porinskog proteina OmpK36, promjene unutar L3 omče smanjuju mogućnost prolaska karbapenema i cefalosporina iz okoliša u bakteriju preko porina OmpK36. L3 omča oblikuje otvor pore OmpK36 porina i omogućava promjene u promjeru otvora pore kanala, stoga svaka promjena u sekvenci ovog proteina dovodi do smanjenja provodljivosti porinskog kanala (Wise i sur., 2018.).

1.5. Cilj istraživanja

Ovim istraživanjem analizirani su mehanizmi otpornosti na ertapenem u kliničkim izolatima *K. pneumoniae* ST437, klona koji je do pojave i širenja enterobakterija koje proizvode karbapenemaze, bio glavni pokretač širenja *K. pneumoniae* rezistentnih na ertapenem na području Hrvatske. Analizom slijeda nukleotida i mjerenjem ekspresije gena *ompK35* i *ompK36* utvrđena je povezanost strukturnih promjena i razine ekspresije najznačajnijih porinskih kanala u *K. pneumoniae* s razvojem otpornosti na ertapenem.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Popis materijala

2.1.1. Kemikalije i reagensi

- Agaroz (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)
- Izopropanol (CLARO-PROM d.o.o., Republika Hrvatska)
- Kloroform (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (95%) (T.T.T d.o.o., Republika Hrvatska)
- 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)

2.1.2. 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

Gotove komercijalne hranjive podloge:

- Krvni agar (5% konjska krv, „Blood agar base“, BioRad, SAD)
- MH bujon (Mueller Hinton II Broth, BD, Njemačka)
- CA-MH bujon (Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted), BD, Njemačka)

2.1.3. Boje

- Sybr® Safe (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Bromfenol-plavo (Fluka Analytical, Švicarska)
- Ksilen-cijanol (Sigma Life Science, SAD)
- 6X pufer za nanošenje uzoraka (0,25% m/v bromfenol-plavo, 0,25% m/v ksilen-cijanol, 30% v/v glicerol)

2.1.4. Standardi molekulskih masa

- GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, SAD)

2.1.5. Enzimi, proteini i reakcijski puferi

- DNaza („Turbo™ Dnase“, 2 U/μl, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Alkalna fosfataza škampa („FastAP™“, 1 U/μl, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Egzonukleaza I („Exonuclease I“, 20 U/μl, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 10X „Turbo™ Dnase Buffer“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Hot Start Taq-polimeraza („Hot Start Polymerase“, Jena Bioscience, Njemačka)
- 10X PCR pufer („Crystal PCR Buffer“, 20 mM MgCl₂, Jena Bioscience, Njemačka)
- M-MLV reverzna transkriptaza („Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“, 200 U/μL, Promega, SAD)
- 5 X pufer „M-MLV RT“ („M-MLV RT 5X Buffer“, Promega, SAD)
- Nukleaza S1 („S1 Nuclease“, 100 U/μL, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Inhibitor RNaze („RNasin® Inhibitor“, Promega, SAD)

2.1.6. Nukleinske kiseline

- Smjesa deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp® 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, 3 i 4 („Invitrogen“, Thermo Fisher Scientific, SAD)

2.1.7. 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)

2.1.8. Potrošni materijal

- Plastične kivete za UV-VIS spektrofotometriju („Uvette®“, Eppendorf®, Njemačka)
- Polipropilenske mikroeprovete od 200 µL u nizu od 8 mikroeproveta („MicroAmp® 8 Strip Reaction Tubes“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenski optički poklopci u nizu od 8 („MicroAmp® Optical 8 cap Strips“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenski poklopci u nizu od 8 („MicroAmp® 8 cap Strips“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenska mikroeproveta za centrifugu 1,5 mL (Eppendorf®, Njemačka)
- Polipropilenska mikroeproveta za centrifugu 2 mL (Eppendorf®, Njemačka)

2.1.9. Uređaji

- DNA-sekvencer „ABI Prism® 310“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Kadica za horizontalnu elektroforezu („Sub-Cell® Model 96 cell“, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Napajanje za horizontalnu elektroforezu („Powerpac™ Basic“, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Spektrofotometar za UV-VIS spektrofotometriju („Biophotometer®“, Eppendorf®, Njemačka)
- Termo mikser („Thermomixer Comfort“, Eppendorf®, Njemačka)
- Uređaj za centrifugu „Eppendorf Centrifuge 5417 R“ (Eppendorf®, Njemačka)
- Uređaj za centrifugu „Eppendorf Centrifuge 5430“ (Eppendorf®, Njemačka)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)

- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV- svjetlošću OmniDOC (Cleaver Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Vodena kupelj s tresilicom (Thermo Forma, SAD)

2.2. METODE

2.2.1. Bakterijski izolati

U istraživanju su korištena 23 klinička bakterijska izolata *K. pneumoniae* klonskog tipa ST437 prikupljena u bolnicama na području grada Zagreba tijekom 2011. i 2012. godine (Tablica 1.). Testiranjima u Referentnom centru za praćenje otpornosti bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva pri Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ utvrđena je smanjena osjetljivost na karbapeneme i rezistentnost na ertapenem prema smjernicama EUCAST-a (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013.). Svi su analizirani izolati proizvodili beta-laktamazu proširenog spektra (ESBL) CTX-M-15 i pripadali klonskom tipu ST437 *K. pneumoniae*. Analizirani izolati su bili višestruko rezistentnog fenotipa.

Kao kontrolni soj korišten je ATCC 13883 (engl. American Type Culture Collection), *K. pneumoniae* osjetljiv na karbapeneme kojeg karakterizira normalna ekspresija porinskih kanala OmpK35 i OmpK36.

Tablica 1. Bakterijski izolati *K. pneumoniae* korišteni u istraživanju

Broj izolata	Fenotip izolata	Ustanova	Grad
11/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
14/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
73/E	ESBL	KB Merkur	Zagreb
90/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
96/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
109/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
122/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
130/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
140/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
141/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
151/E	ESBL	KB Merkur	Zagreb
159/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb
160/E	ESBL	KB Merkur	Zagreb
189/E	ESBL	KBC „Sestre milosrdnice“	Zagreb
190/E	ESBL	KBC „Sestre milosrdnice“	Zagreb
276/E	ESBL	KB Merkur	Zagreb
317/E	ESBL	KB Merkur	Zagreb
340/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb
375/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb
377/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb
381/E	ESBL	Klinika za infektivne bolesti	Zagreb
396/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb
397/E	ESBL	KB Dubrava	Zagreb

2.2.2. Mjerenje minimalnih inhibitornih koncentracija ertapenema kod *K. pneumoniae*

Minimalne inhibitorne koncentracije (engl. minimal inhibitory concentration, MIC) ertapenema određene su metodom mikrodilucije u bujonu. Ovom metodom određena je minimalna koncentracija antibiotika koja inhibira ili ubije bakteriju. Iz prekonocne bakterijske kulture uzgajane inkubacijom na 37°C na krvom agaru (5% konjska krv, „Blood agar base“, BioRad, SAD) ezom je prikupljeno nekoliko kolonija. U fiziološkoj otopini napravljena je suspenzija bakterijskih stanica optičke gustoće koja odgovara standardu 0,5 McFarlanda (1 McF, $\sim 10^8$ CFU/mL). 50 μ L bakterijske suspenzije razrijeđeno je 100x u destiliranoj vodi. Radna otopina ispitivanog soja je potom 10 sekundi vorteksirana. Na jednokratnu mikrotitarsku pločicu, koja je sadržavala različite koncentracije antibiotika (Slika 3.) (0,125 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L i 32 mg/L), nanešeno je po 50 μ L radne otopine bakterijskog soja i inkubirano preko noći na 37°C. Rezultati su očitani pomoću postolja s ogledalom i interpretirani prema EUCAST-ovim smjernicama (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.). Kao pozitivna kontrola korišten je soj koji je prethodno okarakteriziran kao rezistentan na ertapenem, PC KPC (engl. positive control KPC).

1*	2**	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0	prazno	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32

Slika 3. Prikaz rasporeda koncentracija antibiotika u jažicama

* negativna kontrola, ** pozitivna kontrola

2.2.3. Detekcija i karakterizacija gena za otpornost na antibiotike

2.2.3.1. Izolacija ukupne bakterijske DNA

Izolacija ukupne bakterijske DNA svih kliničkih izolata provedena je metodom kuhanja. Materijal za izolaciju DNA prikupljen je iz jedne bakterijske kolonije iz prekonocne kulture pomoću jednokratne eze. Bakterije su uzgajane preko noći na krvnom agaru. Sakupljeni biološki materijal otopljen je u 100 μ L sterilne-ultra čiste vode („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka) i inkubiran 10 minuta na 99°C na termo mikseru („Thermomixer Comfort“, Eppendorf®, Njemačka). Centrifugiranjem 5 minuta na 25°C pri 20000xg u uređaju za centrifugu („Eppendorf Centrifuge 5417 R“, Eppendorf®, Njemačka) odijeljena je ukupna bakterijska DNA od ostalih staničnih komponenti. 80 μ L supernatanta, u kojem se nalazi bakterijska DNA, dekantirano je u novu 1,5 mL polipropilensku mikroepruvetu za centrifugu (Eppendorf®, Njemačka). Ukupna izolirana DNA pohranjena je na -20°C.

2.2.3.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) provedena je za dokazivanje prisutnosti gena porinskih kanala *OmpK35* i *OmpK36* kod kliničkih izolata *K. pneumoniae* te za umnažanje fragmenata DNA kojima je nakon toga određivan slijed nukleotida.

Lančane reakcije polimerazom provedene su u ukupnom volumenu od 10 µL s jednim parom početnica („singleplex reakcija“). 1 µL izolirane genomske DNA korišten je kao kalup u ukupnom volumenu PCR-a koji je iznosio 10 µL. Reakcijska smjesa se sastojala od: 1X PCR pufer (20 mM MgCl₂) („Crystal PCR Buffer“, Jena Bioscience, Njemačka), 200 µM svakog deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp® dNTP blend“, Thermo Fisher Scientific, SAD), početnice u koncentraciji od 200 nm (svaka) za gene *ompK35* i *ompK36* (Tablica 2.), 0.35 U HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Polymerase“, Jena Bioscience, Njemačka) i do volumena od 10 µL dodana je sterilna ultra-čista voda („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka).

Tablica 2. Slijed nukleotida u početnicama korištenim za detekciju gena *ompK35* i *ompK36* pomoću PCR-a

Gen	Ime početnice	Smjer nukleotida (5'→3')	Smjer	Položaj početnice	Veličina amplikona (pb)
<i>ompK35</i>	<i>ompK35</i> OF1	ATGATGAAGCGCAATATTCTG	F	0-21	1080
	<i>ompK35</i> OR1	TTAGAACTGGTAAACGATACCC	R	1057-1080	
<i>ompK36</i>	<i>ompK36</i> F	TTAAAGTACTGTCCCTCCTGG	F	7-28	1088
	<i>ompK36</i> OR1	GTAAACCAGGCCAGTG	R	1078-1095	

Metoda lančane reakcije polimerazom izvedena je prema sljedećim uvjetima: aktivacija HotStart Taq-polimeraze i početna denaturacija DNA kalupa u trajanju od 1 minute i 30 sekunda na 94°C. Faza amplifikacije PCR produkta ponavljana je u 30 ciklusa u tri koraka (Tablica 3.). Nakon faze amplifikacije slijedi faza završne elongacije na 72°C u trajanju od 2 minute. Zadnja faza je faza hlađenja reakcije na 4°C. Umnožena DNA pohranjena je na -20°C.

Sve lančane reakcije polimerazom provedene su u „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Tablica 3. Koraci faze amplifikacije PCR produkta

Faza	Temperatura	Trajanje
Denaturacija DNA kalupa	94°C	20 sekunda
Sparivanje početnica i denaturiranog kalupa DNA, engl. „annealing“	55°C	25 sekunda
Elongacija **	72°C	1 minutu i 10 sekunda

**sintetizira se komplementarni lanac DNA

Produkti dobiveni lančanom reakcijom polimeraze provjereni su horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u 1X TAE puferu u koji je dodano 3 µL interkalacijske boje Syber™ Safe (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za horizontalnu elektroforezu korištena je aparatura „Sub-Cell™ Model 96 cell“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) i napajanje „PowerPac™ Basic power supply“ (Bio-Rad Laboratories, SAD). Elektroforeza u trajanju 30 min izvedena je pri 130V u 1xTAE puferu. 10 µL PCR reakcije pomiješano je s 2 µL 6x pufera za nanošenje uzoraka (0,25% m/v bromfenol-plava, 30% v/v glicerol, 0,25% v/v ksilen-cijanol). „GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) korišten je kao marker za provjeru veličine PCR fragmenta. Produkti na gelu su vizualizirani pomoću sustava za digitalnu fotografiju („Omni DOC“, Cleaver Scientific, UK) koristeći UV-svjetlost.

2.2.3.3. Određivanje slijeda nukleotida

Nakon što je potvrđena prisutnost gena *ompK35* odnosno *ompK36* u kliničkim izolatima *K. pneumoniae*, fragmenti DNA s tim genima su umnoženi koristeći početnice nabrojane u Tablica 4. kako bi se odredio slijed nukleotida u genima *ompK35* i *ompK36*. Geni su umnoženi lančanom reakcijom polimeraze u volumenima od 20 µl od čega je volumen izolirane ukupne bakterijske DNA iznosio 2 µl, volumen reakcijske smjese iznosio je 18 µl sa sastavom opisanim u poglavlju 2.2.3.2.. Lančana reakcija polimerazom provedena je prema uvjetima opisanim u poglavlju 2.2.3.2., faza amplifikacije provedena je u 35 ciklusa. Prisutnost PCR produkta provjerena je horizontalnom gel elektroforezom i vizualiziranjem na gelu kao što je opisano u prethodnom poglavlju (2.2.3.2.).

Tablica 4. Nukleotidni slijedovi početnica korištenih za umažanje *ompK35* i *ompK36* gena u svrhu sekvenciranja

Gen	Ime početnice	Smjer	Slijed nukleotida (5'→3')	Položaj početnice
<i>ompK35</i>	<i>ompK35</i> OF1	F	ATGATGAAGCGCAATATTCTG	0-21
	<i>ompK35</i> OR1	R	TTAGAACTGGTAAACGATACCC	1057-1080
	<i>ompK35</i> SF1	F	CGTCCAATGTTGAAGGTTC	253-272
	<i>ompK35</i> SF2	F	ACAGACCAAAGGCAAGG	860-877
	<i>ompK35</i> R	R	ACCATTTTTCCATAGAAGTCCAGT	95-119
<i>ompK36</i>	<i>ompK36</i> F	F	TTAAAGTACTGTCCCTCCTGG	7-28
	<i>ompK36</i> OR1	R	GTAAACCAGGCCAGTG	1078-1095
	<i>ompK36</i> SF1	F	GGACTCGTCTGGCATTTC	280-297
	<i>ompK36</i> SF2	F	CGAAGTGGTTGCTCAGT	842-859
	<i>ompK36</i> R	R	TCAGAGAAGTAGTGCAGACCGTCA	113-137
	<i>ompK36</i> SR1	R	ACTGAGCAACCACTTCG	842-859

Pročišćavanje PCR produkta Exo-SaP metodom

Umnoženi PCR produkti su pročišćeni koristeći smjesu egzonukelaze I (engl. exonuclease I, ExoI) i alkalne fosfataze škampa (engl. shrimp alkaline phosphatase, SaP). Pročišćavanje je provedeno u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 3,75 µL. Reakcijska smjesa se sastojala od 1 µL alkalne fosfataze škampa („FastAP™“, Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,25 µL egzonukelaze I („Exonuclease I“, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 2,5 µL produkta dobivenog PCR-om. Pomoću uređaja „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) je provedena inkubaciju uzorka. Inkubacija se sastoji od tri koraka: I) inkubacija uzorka 20 min na 37°C, II) inaktivacija enzima inkubacijom u trajanju od 15 min na 80°C, III) hlađenje uzoraka nakon inkubacije na 4°C. Nakon inkubacije u uzorke je dodano 10 µL sterilne ultra-čiste vode („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka).

Priprema BigDye reakcije za sekvenciranje

Za sekvenciranje su korištene početnice specifične za gene od interesa i reagense „ABI PRISM BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Ukupni volumen reakcijskih smjesa za sekvenciranje iznosio je 3 μL : početnica u koncentraciji 1,6 pM, 0,6 μL „BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix“, 0,3 μL „5X Sequencing Buffer“ i 1 μL pročišćenog PCR produkta.

Reakcije za sekvenciranje su umnožene koristeći „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) u sljedećim koracima: početna denaturacija DNA kalupa 1 minutu na 96°C, sinteza DNA lanca s obilježenim dideoksinukleotidima unutar 25 ciklusa i na kraju se reakcije hlade na 4°C. Faza sinteze DNA lanca s obilježenim dideoksinukleotidima se sastoji od tri koraka: I) denaturacija kalupa 10 sekundi na 96°C, II) sparivanje 5 sekundi na 50°C, III) elongacija na 60°C tijekom 4 minute.

Pročišćavanje BigDye reakcije prije sekvenciranja

Metoda pročišćavanja reakcije prije sekvenciranje izvedena je precipitacijom etanolom/EDTA/natrijevim acetatom. Za pripremu otopine etanol/EDTA/natrijev acetat se koristi 125mM otopina EDTA pH 8,0, 3M otopina natrijevog acetata i 96%-tni etanol. U 3 μL BigDye reakcije je dodano 9,3 μL otopine etanol/EDTA/natrijev acetat (0,3 μL EDTA, 0,3 μL natrijevog acetata i 8,7 μL 96%-tnog etanola) i sadržaj je pomiješan inverzijom polipropilenske mikroepuvete. Reakcije su inkubirane 20 minuta u mraku i potom centrifugirane 35 minuta na 2100xg. Supernatant se odbaci, a naopako okrenute otvorene polipropilenske mikroepuvete se centrifugiraju 30 sekundi pri 170xg. Talog u polipropilenskoj mikroepuveti se ispere s 15 μL 70%-tnog etanola, inverzijom se promiješa sadržaj zatvorene polipropilenske mikroepuvete i centrifugira 15 minuta na 1 650xg. Supernatant se dekantira, dok se otvorene, naopako okrenute polipropilenske mikroepuvete centrifugiraju 30 sekundi pri 170xg. Talog se otopi s 25 μL deioniziranog formamida („Hi-Di™ Formamide“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci se pohrane na -20°C.

Slijed nukleotida ispitanih gena je određen iz 10 μL pročišćenog produkta otopljenog u „Hi-Di™ Formamide“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) analiziranih pomoću uređaja za sekvenciranje „ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Korištenjem programa „DNA Baser“ (Heracle BioSoft SRL, Rumunjska) su složene cjelovite sekvence DNA iz fragmenata DNA dobivenih sekvenciranjem. Sravnavanje DNA sekvenci je napravljeno korištenjem programa CLUSTAL Omega (ebi.ac.uk). Pomoću ovog programa je napravljeno i sravnavanje proteinskih sekvenci kako bi se analizirale eventualne promjene koje mutacije uzrokuju u genima *ompK35* i *ompK36*. Sekvence DNA su prethodno translahirane u proteinske sekvence pomoću online programa „ExpASy- Translate tool“ (web.expasy.org).

2.2.4. Mjerenje ekspresije gena koji kodiraju za porinske kanale

2.2.4.1. Izolacija ukupne bakterijske RNA

Jednom kolonijom iz bakterijske kulture uzgojene na krvnom agaru je inokulirano 5 mL neselektivnog medija LB (10g/L Bakto-tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L ekstrakt kvasca, pH 7,5). Kultura je uzgajana na 37°C preko noći uz trešnju 50 rpm. 100 µL bakterijske prekonoćne kulture je potom inokulirano u novih 5 mL neselektivnog LB medija otprilike 3-4 sata, odnosno do eksponencijalne faze rasta (OD_{600} 0,5-0,7) na 37°C i na 50 rpm. Bakterijske stanice su prikupljene centrifugiranjem 4 mL bakterijske kulture na 1000xg tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se odlije, na talog bakterijskih stanica se doda 1 mL „TriPure“ reagensa (Roche, Švicarska) i talog se resuspendira. „TriPure“ reagens lizira stanicu, pri čemu se oslobađa stanični sadržaj i može se izolirati RNA (engl. ribonucleic acid) potrebna za daljnje analize.

Resuspendirane bakterijske stanice se inkubiraju 10 minuta na 65°C uz trešnju 1 400 rpm. Suspenzija se hladi do sobne temperature nakon inkubacije i doda joj se 200 µL kloroforma (T.T.T d.o.o., RH). Uzorci se vorteksiraju 15 sekundi i inkubiraju na sobnoj temperaturi 10 minuta uz trešnju 1 000 rpm. Bakterijski lizat se u sljedećem koraku centrifugira 15 minuta pri 4°C na 12000xg. Nakon centrifugiranja 450 µL vodene faze se otpipetira u 1,5 mL polipropilensku mikroeprovetu za mikrocentrifugiranje. 500 µL izopropanola (CLARO-PROM d.o.o., RH) dodano je vodenoj fazi i izmiješano inverzijom. RNA se istaloži inkubacijom tijekom 24 sata na -20°C. Po završetku inkubacije, RNA se istaloži centrifugiranjem na 15000xg tijekom 20 minuta na 4°C. Supernatant se odbaci, dok se talog ispere dva puta sa 75%-tnim etanolom, te centrifugira na 15 000xg pri 4°C tijekom 15 minuta. Tijekom drugog ispiranja 70%-tni etanol se ostavi u polipropilenskoj mikroepreveti i inkubira preko noći, te potom odlije i ukloni dodatno pipetom. Talog RNA se suši na sobnoj temperaturi 30 minuta unutar laminara za izolaciju RNA pod strujanjem zraka do 0,45 m/s. Iza sušenja slijedi otapanje taloga RNA u 65 µL sterilne ultra-čiste vode tretirane dietil-pirokarbonatom („Ambion™ DEPC-Treated Water“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Otopljenu RNA inkubiramo 10 minuta na 60°C za još bolje otapanje RNA. Mjerenjem apsorbancije 15 µL izolirane RNA na 260 nm i 280 nm je određena čistoća i koncentracija RNA u uzorcima. Omjeri A_{260}/A_{280} dobiveni UV/VIS spektrofotometrijom za čistu RNA iznose 1,8-2,1. Ovi omjeri ukazuju na onečišćenost uzorka RNA proteinskim komponentama. Na kontaminaciju fenolnim spojevima, solima iz reagensa i gvanidin-izotiocijanatom ukazuje omjer A_{260}/A_{230} i za čistu RNA iznosi iznad 1,8. DNazom tretirana RNA bi trebala biti oslobođena zaostale DNA. U konačni reakcijski volumen od 25 µL se doda 5 µg RNA, 2,5 µL 1x reakcijskog pufera

(„Turbo™ Dnase Buffer“, Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,5 µL Dnaze („Turbo™ Dnase“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Ostatak do 25 µL nadopunimo sterilnom ultra-čistom vodom. U uređaju „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) 30 minuta na 37°C se provodi inkubacija tijekom koje dolazi do razgradnje zaostale DNA u uzorku RNA. Nakon inkubacije u svaki uzorak dodano 2 µL (67,5 µM) EDTA. DNaza je inaktivirana inkubacijom 10 minuta na 75°C koristeći „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci se pohrane na -80°C.

2.2.4.2. Obrnuto prepisivanje RNA (reverzna transkripcija)

Enzim reverzna transkriptaza prepisuje RNA kalup u komplementarnu jednolančanu DNA (engl. complementary DNA, cDNA) u procesu reverzne transkripciji. Kratke početnice su komplementarne 3' kraju RNA i usmjeravaju sintezu prvog lanca cDNA. Ovaj proces omogućava virusima umetanje svoje DNA (cDNA) u stanicu domaćina i tako osigurava sintezu novih virusnih čestica od strane stanice domaćina. cDNA dobivena reverznom transkripcijom u laboratoriju se može koristiti kao kalup za PCR. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu koristi cDNA kao kalup za analizu ekspresije gena od interesa.

Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju je sadržavala početnice duge 6 nukleotida koje imaju nasumičan slijed nukleotida. Heksamerne početnice nasumičnog slijeda nukleotida prepisuju cijelu RNA uzorka, a ne specifični gen.

Ukupni volumen reakcijske smjese po jednom uzorku je iznosio 12,5 µL i imao sastav: 1 µg RNA tretirane Dnazom, 500 ng nasumičnih heksamernih početnica („Random Primers“, Promega, SAD), 0,5 ng svakog deoksinukleozid-trifosfata („Geneamp™ dNTP blend“, Thermo Fisher Scientific, SAD), 12 U inhibitora Rnaze („Rnasin™ Inhibitor“, Promega, SAD), 1X „M-MLV RT“ pufera (Promega, SAD), 100 U enzima „M-MLV“ reverzne transkriptaze („Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“, Promega, SAD). Ostatak volumena do 12,5 µL nadopunjen je sterilnom ultra-čistom vodom.

U prvom koraku je pomiješano 5 µL RNA tretirane DNazom i 1 µL nasumičnih heksamernih početnica. Reakcija se inkubira u uređaju „Veriti™ Thermal Cycler“ 5 minuta na 70°C kako bi došlo do denaturacije i nakon toga se uzorci stavljaju na led da bi što sporije došlo do sparivanja komplementarnih početnica. U svaki uzorak se dodaju ostali sastojci reakcijske smjese do volumena 12,5 µL, te u uređaju „Veriti™ Thermal Cycler“ inkubiraju 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, cDNA je razrijeđena s 27,5 µL sterilne ultra-čiste vode do ukupnog volumena od 40 µL.

2.2.4.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Razina ekspresije gena koji kodiraju transmembranske porinske kanale OmpK35 i OmpK36 kod izolata *K. pneumoniae* određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. quantitative real-time PCR, qRT-PCR). Početnice korištene za analizu ekspresije gena *ompK35* i *ompK36* su prikazane u tablici (Tablica 5.).

Tablica 5. Početnice korištene za analizu relativne ekspresije gena *ompK35* i *ompK36*, te za analizu konstitutivnog gena *rpoB*

Gen	Ime početnice	Smjer nukleotida (5'→3')	Smjer	Ta (°C)	Položaj početnice
<i>ompK35</i>	<i>ompK35F</i>	GCAATATTCTGGCAGTGGTGATC	F	55	11-34
	<i>ompK35R</i>	ACCATTTTTCCATAGAAGTCCAGT	R		95-119
<i>ompK36</i>	<i>ompK36F</i>	TTAAAGTACTGTCCCTCCTGG	F		8-29
	<i>ompK36R</i>	TCAGAGAAGTAGTGCAGACCGTCA	R		113-137
<i>rpoB</i>	<i>rpoBF</i>	AAGGCGAATCCAGCTTGTTTCAGC	F		1916-1939
	<i>rpoBR</i>	TGACGTTGCATGTTTCGCACCCATCA	R		2038-2063

Konstitutivni gen *rpoB* kodira beta podjedinicu bakterijske RNA polimeraze. Ovaj gen je prisutan u svim bakterijskim izolatima i konstitutivno je eksprimiran kao osnovni gen odgovoran za održavanje osnovne stanične funkcije. Gen *rpoB* se koristi za normalizaciju razine mRNA gena od interesa prije same usporedbe sa različitim uzorcima tijekom qRT-PCR.

Kvantitativna lančana reakcija u stvarnom vremenu je izvedena u ukupnom volumenu od 10 µL po uzorku, odnosno 1x koncentracija enzimske otopine „2x Quantitect™ Sybr™ Green“ (Qiagen, Njemačka), početnice u konačnoj koncentraciji od 500 nM, 2 µL sterilne ultra-čiste vode i 2 µL cDNA uzorka tj. ekvivalent od 50 ng cDNA. Svakom izolatu je ekspresija gena mjerena u triplicatu pomoću uređaja „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Prvo se odvijala faza denaturacije cDNA kalupa i aktivacije Taq-polimeraze 15 min na 95°C, zatim faza amplifikacije koja se ponavlja 40 puta u 3 koraka (Tablica 6.), zadnja je faza disocijacijska reakcija.

Tablica 6. Koraci u fazi amplifikacije u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu

Faza	Temperatura	Trajanje
Denaturacija	95°C	15 sekundi
Sparivanje početnica, „annealing“	55°C	20 sekundi
Elongacija	72°C	30 sekundi

Disocijacijska reakcija se koristi kako bi se dobila krivulju taljenja PCR produkta i kao pokazatelj specifičnosti qRT-PCR reakcije. Nakon svakog ciklusa amplifikacije se mjeri fluorescencija reakcija. Fluorescenciju se može mjeriti zbog korištenja fluorofora Sybr green koji se nasumično interkalira u dvolančanu DNA. Kada detektirana fluorescencija prijeđe pozadinsku fluorescenciju kaže se da je došla do kritičnog ciklusa prelaska praga (C_T –treshold cycle) koji je inverzno proporcionalan logaritmu početnog broja molekula kalupa. Koristeći program „StepOnePlus™ Software v2.3“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) su analizirani rezultati dobiveni qRT-PCRom i određene su vrijednosti kritičnih ciklusa prelaska praga i krivulje taljenja DNA produkta. Za usporedbu razine ekspresije gena između različitih izolata korišten je izolat divljeg tipa ATCC 13883, kao kontrola.

2.2.5. Statistička analiza

Za analizu podataka dobivenih qRT-PCR-om, te usporedbu razine ekspresije gena *ompK35* i *ompK36* između analiziranih izolata i soja ATCC 13883 korišten je Studentov t-test. Uspoređivane su $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti analiziranih sojeva. Korelacija između razine ekspresije porinskih kanala *OmpK35* odnosno *OmpK36* i minimalnih inhibitornih koncentracija određena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije korištenjem računalnog programa IBM SPSS Statistics.

3. REZULTATI

3.1. Mjerenje minimalnih inhibitornih koncentracija ertapenema kod *K. pneumoniae*

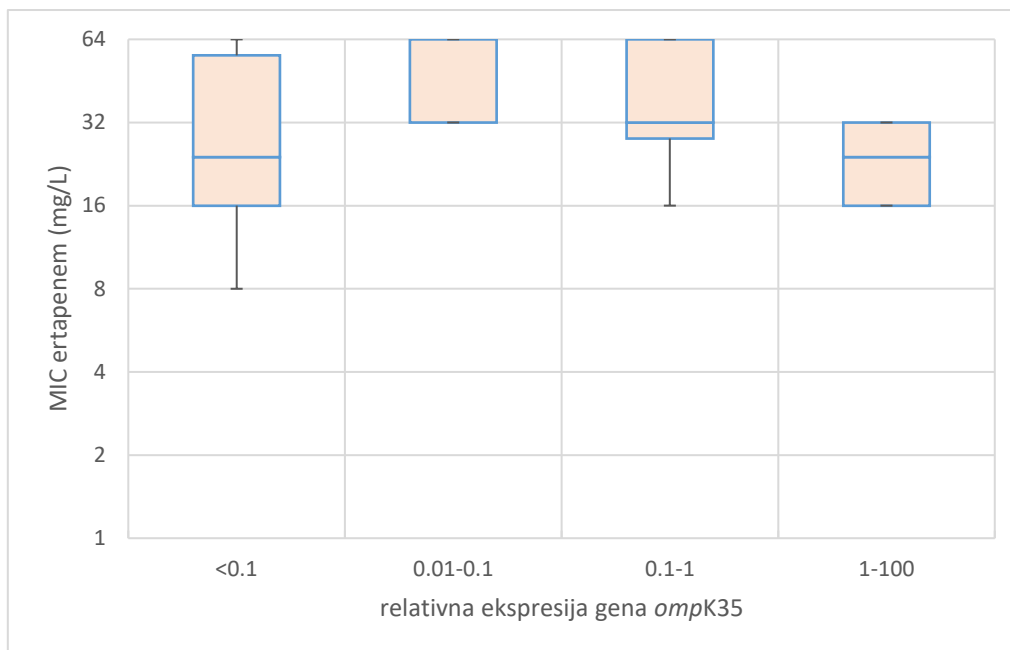
Interpretacijom rezultata, prema EUCAST smjernicama, dobivenih mjerenjem minimalnih inhibitornih koncentracija ertapenema za kliničke izolate *K. pneumoniae* je dokazano da su svi izolati rezistentni na ertapenem, osim kontrolnog soja ATCC 13883 osjetljivog na ertapenem (Tablica 7.). Prema EUCAST standardima izolati se dijele na osjetljive ($MIC \leq 0.5$ mg/L), intermedijarno osjetljive ($MIC = 1$ mg/L) i rezistentne ($MIC \geq 2$ mg/L).

30.4% izolata imalo je $MIC > 32$ mg/L, 34.8% izolata imalo je vrijednost $MIC = 16$ mg/L, 30.4% izolata imalo je vrijednost $MIC = 32$ mg/L, dok je samo jedan izolat imao $MIC = 8$ mg/L.

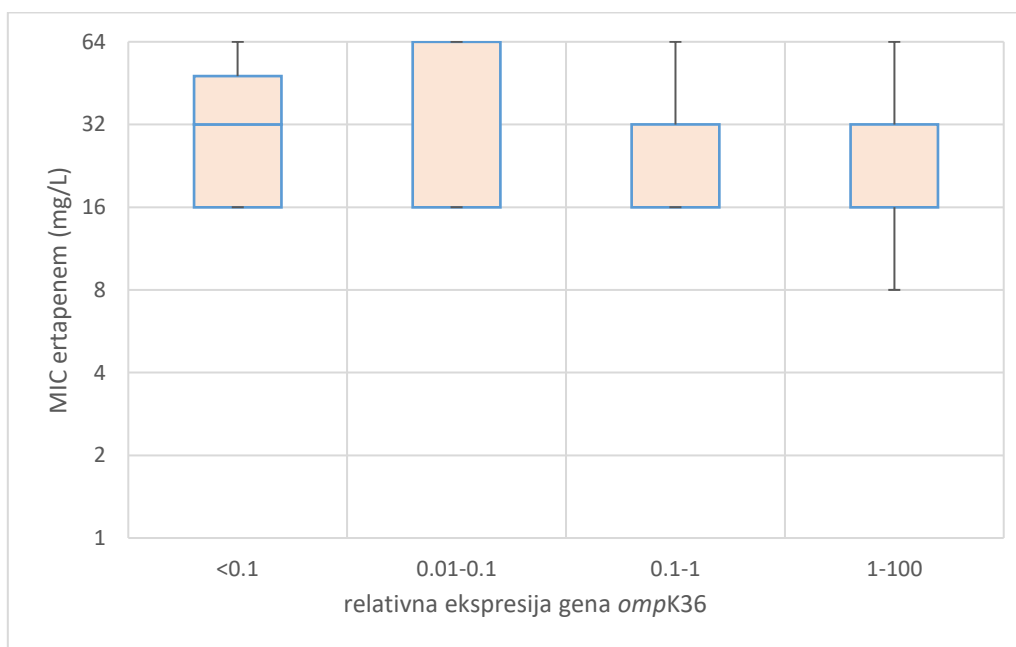
Tablica 7. Minimalne inhibitorne koncentracije (mg/L) ertapenema za ispitivane kliničke izolate, kontrolni soj ATCC 13883 i pozitivnu kontrolu (PC KPC); + označava rast pri određenoj koncentraciji

Izolat	Koncentracija (mg/L)									
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32
ATCC	+	+								
PC KPC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11/E	+	+	+	+	+	+	+			
14/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
73/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96/E	+	+	+	+	+	+	+			
109/E	+	+	+	+	+	+	+			
122/E	+	+	+	+	+	+	+			
130/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
140/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
141/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
151/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
159/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
160/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
189/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
190/E	+	+	+	+	+	+	+	+		
276/E	+	+	+	+	+	+	+			
317/E	+	+	+	+	+	+	+			
340/E	+	+	+	+	+	+				
375/E	+	+	+	+	+	+	+			
377/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
381/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
396/E	+	+	+	+	+	+	+			
397/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

MIC-ovi koji su prelazili 32 mg/L su pri računanju korelacije svrstani u kategoriju MIC 64 mg/L radi lakše analize podataka.



Slika 4. Razina ekspresije gena *ompK35* u usporedbi s kontrolnim sojem ATCC 13883 i u ovisnosti o MIC-ovima ertapenema. Na grafu su prikazani MIC-ovi preko medijana i rasponi interkvartila, razlika između minimalnih vrijednosti odnosno maksimalne vrijednosti MIC-ova i gornjeg odnosno donjeg (Q3 i Q1) interkvartila je korištena kao prikaz pogreške.



Slika 5. Razina ekspresije gena *ompK36* u usporedbi s kontrolnim sojem ATCC 13883 i u ovisnosti o MIC-ovima ertapenema. Na grafu su prikazani MIC-ovi preko medijana i rasponi interkvartila, razlika između minimalnih vrijednosti odnosno maksimalne vrijednosti MIC-ova i gornjeg odnosno donjeg (Q3 i Q1) interkvartila je korištena kao prikaz pogreške.

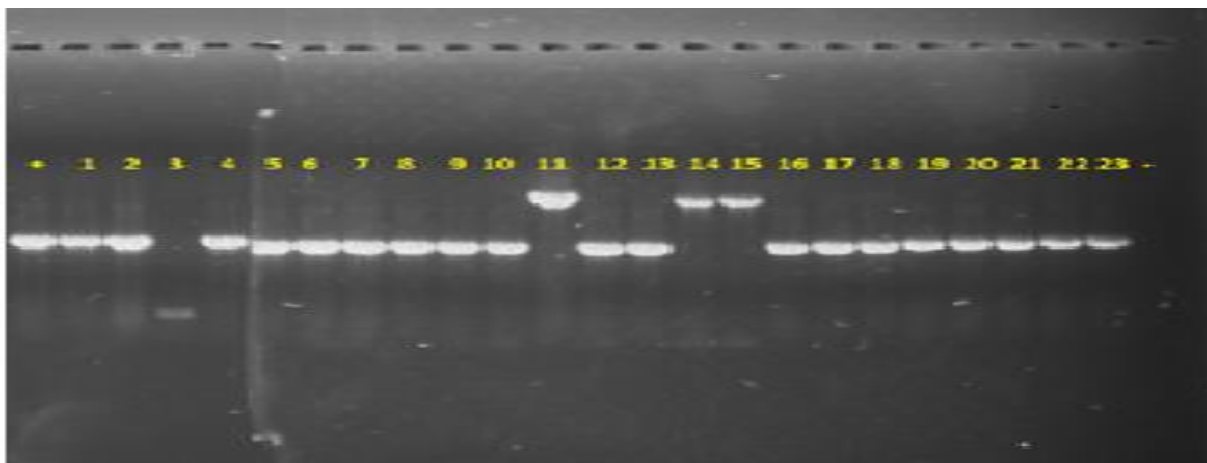
Nije utvrđena korelacija između ekspresije gena *ompK35* i otpornosti na ertapenem ($r=0,124$, $p=0,57$), niti između ekspresije gena *ompK36* i MIC-ova ertapenema ($r=0,303$, $p=0,16$) (Slika 4. i Slika 5.). Korelacija između ekspresije gena *ompK35* tj. *ompK36* i otpornosti na ertapenem nije statistički značajna ($p<0,05$).

3.2. Detekcija i karakterizacija gena za porinske kanale Ompk35 i Ompk36

Lančanom reakcijom polimerazom je dokazana prisutnost gena *ompK35* i *ompK36* kod analiziranih izolata. Izolatu 73/E lančanom reakcijom polimerazom nije detektiran gen *ompK36* (Slika 6. i Slika 7.).



Slika 6. Prisutnost gena *ompK35* detektirana metodom lančane reakcije polimerazom kod kliničkih izolata *K. pneumoniae* (M-standard molekulske masa, + pozitivna kontrola, 1-izolat 11/E, 2-izolat 14/E, 3-izolat 73/E, 4-izolat 90/E, 5-izolat 96/E, 6-izolat 109/E, 7-izolat 122/E, 8-izolat 130/E, 9-izolat 140/E, 10-izolat 141/E, 11-izolat 151/E, 12-izolat 159/E, 13-izolat 160/E, 14-izolat 189/E, 15-izolat 190/E, 16-izolat 276/E, 17-izolat 317/E, 18-izolat 340/E, 19-izolat 375/E, 20-izolat 377/E, 21-izolat 381/E, 22-izolat 396/E, 23-izolat 397/E, - negativna kontrola)



Slika 7. Prisutnost gena *ompK36* detektirana metodom lančane reakcije polimerazom kod kliničkih izolata *K. pneumoniae* (+ pozitivna kontrola, 1-izolat 11/E, 2-izolat 14/E, 3-izolat 73/E, 4-izolat 90/E, 5-izolat 96/E, 6-izolat 109/E, 7-izolat 122/E, 8-izolat 130/E, 9-izolat 140/E, 10-izolat 141/E, 11-izolat 151/E, 12-izolat 159/E, 13-izolat 160/E, 14-izolat 189/E, 15-izolat 190/E, 16-izolat 276/E, 17-izolat 317/E, 18-izolat 340/E, 19-izolat 375/E, 20-izolat 377/E, 21-izolat 381/E, 22-izolat 396/E, 23-izolat 397/E, - negativna kontrola)

U ovom istraživanju uspoređena je razlika u ekspresiji porinskih gena *ompK35* i *ompK36* između kliničkih izolata bakterije *K. pneumoniae*, koji su ertapenem rezistentni, i kontrolnog soja ATCC 13883 koji je osjetljiv na ertapenem.

Pri istraživanju ekspresije gena *ompK35* i gena *ompK36* nisu zabilježeni izolati kod kojih nije detektirana ekspresija jednog od dva gena ili oba.

Značajnom se smatrala promjena u ekspresiji gena kada je faktor promjene (engl. fold change) ≥ 2 u odnosu na razinu ekspresije gena u kontrolnom soju, odnosno ≤ 0.5 ($0.5 \geq FC \geq 2$), tj. kada je ekspresija gena bila povećana/smanjena dva puta u odnosu na ekspresiju tog istog gena u kontrolnom soju (ATCC 13883) koji je normalno ekspimirao gene *ompK35* i *ompK36*.

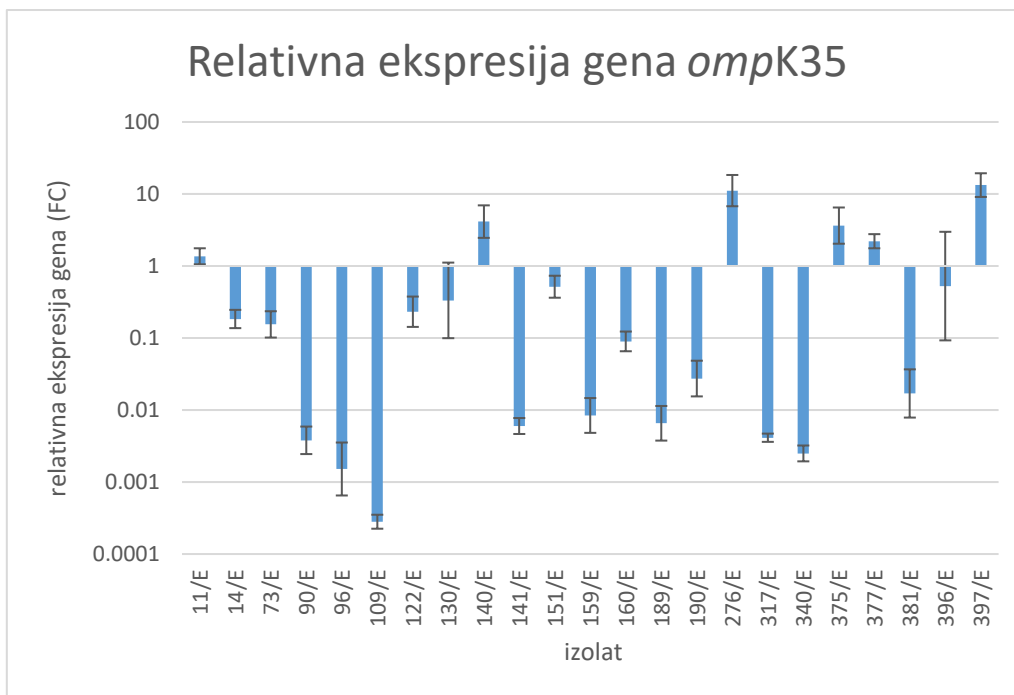
Iz rezultata dobivenih mjerenjem ekspresije gena *ompK35* i *ompK36*, koji kodiraju za porinske kanale, i normalizacijom rezultata u odnosu na konstitutivni gen *rpoB* je prema slijedećim formulama izračunata promjena u razini ekspresije uzorka u odnosu na normalno ekspimirani gen u kontrolnom soju (Slika 8., Slika 9.).

$$\Delta C_t (\text{ompK36, izolat 11}) = C_t (\text{ompK36, izolat 11}) - C_t (\text{rpoB, izolat 11})$$

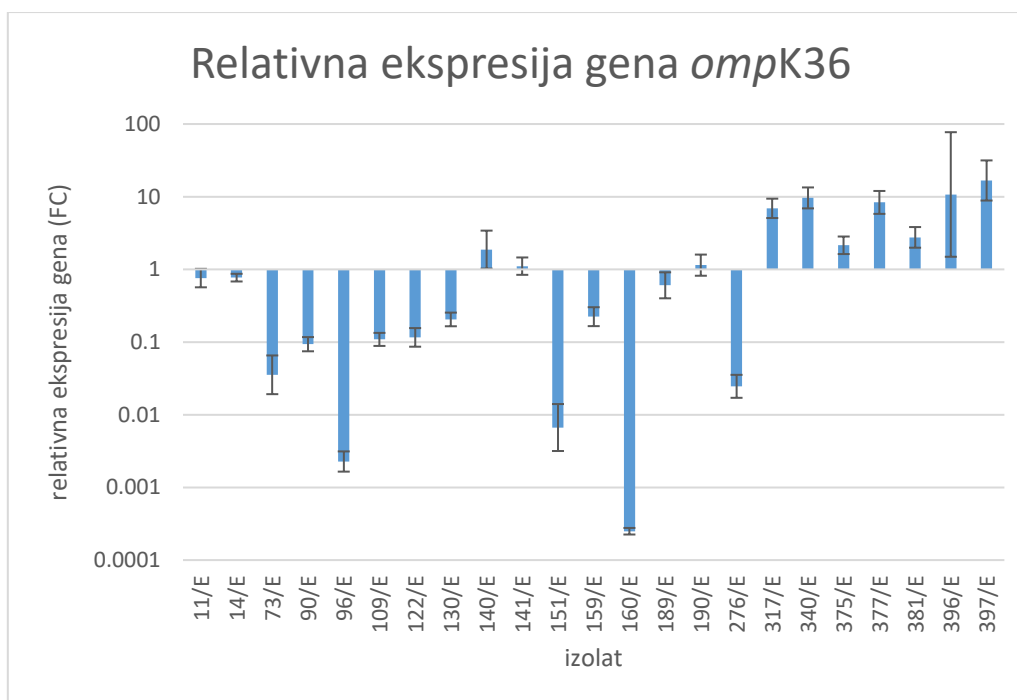
$$\Delta C_t (\text{ompK36, kontrola}) = C_t (\text{ompK36, kontrola}) - C_t (\text{rpoB, kontrola})$$

$$\Delta \Delta C_t (\text{ompK36}) = \Delta C_t (\text{ompK36, izolat 11}) - \Delta C_t (\text{ompK36, kontrola})$$

$$\text{Faktor promjene (FC)} \quad 2^{-\Delta \Delta C_t (\text{ompK36})}$$



Slika 8. Prikaz relativne ekspresije gena *ompK35* kod izolata (u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883). Raspon promjene razine ekspresije uzorka u odnosu na kontrolni soj korišten je kao prikaz pogreške (raspon izračunat $2^{(\Delta\Delta C_T + \Delta C_T SD)}$ tj $\Delta\Delta C_T - \Delta C_T SD$).



Slika 9. Prikaz relativne ekspresije gena *ompK36* kod izolata (u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883). Raspon promjene razine ekspresije uzorka u odnosu na kontrolni soj korišten je kao prikaz pogreške (raspon izračunat $2^{(\Delta\Delta C_T + \Delta C_T SD)}$ tj $\Delta\Delta C_T - \Delta C_T SD$).

Statistički značajna razlika zabilježena je u relativnoj ekspresiji gena *ompK35*. Relativna ekspresija gena *ompK35* u analiziranih izolata *K. pneumoniae* bila je 3,47 puta niža s obzirom na kontrolni soj ATCC 13883 ($p=0,00057$, $p<0,001$). Razina relativne ekspresije gena *ompK36* bila je smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije bila statistički značajna ($p>0,5$).

Tablica 8. Izmjerene razine ekspresije gena *ompK35* i *ompK36* u ispitivanim kliničkim izolatima u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883

Izolat	Srednja vrijednost (raspon) ekspresije gena <i>ompK35</i>	Srednja vrijednost (raspon) ekspresije gena <i>ompK36</i>
11/E	-0,448 (-0,91 - -0,07)	0,397 (0,34 - 0,48)
14/E	2,445 (2,23 - 2,85) *	0,377 (0,16 - 0,56)
73/E	2,694 (2,44 - 2,89)*	4,818 (4,19 - 5,27)*
90/E	8,042 (7,55 - 8,64)*	3,419 (3,15 - 3,86)*
96/E	9,365 (8,31 - 10,84)*	8,782 (8,28 - 9,3)*
109/E	11,797 (11,55 - 12,28)*	3,2 (3,04 - 3,46)*
122/E	2,11 (1,91 - 2,26)*	3,11 (2,59 - 3,38)*
130/E	1,587 (0,01 - 3,47)*	2,288 (1,79 - 2,55)*
140/E	-2,048 (-1,92 - -1,23)*	-0,903 (-1,19 - -0,68)
141/E	7,381 (5,68 - 7,8)*	-0,148 (-0,26 - -0,08)
151/E	0,956 (1,2 - 3,04)*	7,229 (6,27 - 7,77)*
159/E	6,895 (6,21 - 7,35)*	2,162 (1,78 - 2,76)*
160/E	3,479 (1,43 - 4,08)*	11,969 (11,82 - 12,1)*
189/E	7,256 (6,43 - 11,13)*	0,729 (0,25 - 1,37)
190/E	5,192 (4,72 - 5,78)*	-0,193 (-0,64 - -0,44)
276/E	-3,478 (-4,35 - -2,9)*	5,345 (4,69 - 5,75)*
317/E	7,922 (7,67 - 8,09)*	-2,789 (-3,1 - -2,2)*
340/E	8,647 (8,38 - 8,84)*	-3,267 (-3,65 - -2,95)*
375/E	-1,863 (-2,91 - -0,07)*	-1,101 (-1,63 - -0,71)*
377/E	-1,144 (-1,41 - -0,67)*	-3,061 (-3,81 - -2,39)*
381/E	5,88 (5,08 - 7,18)*	-1,463 (-1,76 - -0,98)*
396/E	0,927 (-2,09 - 2,98)*	-3,424 (-5,21 - -0,5)*
397/E	-3,732 (-4,54 - -3,06)*	-4,064 (-5,04 - -3,42)*

*-označava značajnu promjenu ekspresije u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883 (smanjena ekspresija $\leq 0,5$, pojačana ekspresija $\geq 2,00$)

Prilikom analize i usporedbe sekvence gena *ompK35* između kontrolnog soja ATCC 13883 i ispitivanih kliničkih izolata pronađene su tri točkaste mutacije (c.294G→A; c.303G→A; c.786C→T). Analizom proteinskih sekvenci utvrđeno je da navedene točkaste mutacije nisu utjecale na promjenu slijeda aminokiselina unutar proteina OmpK35. Kod 73.9% izolata izmjerena je značajno smanjena ekspresija gena *ompK35*, dok je 21,7% izolata imalo značajno pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883, izolat 73/E imao je pojačanu ekspresiju gena *ompK35* (ne značajno, $FC<2$).

Usporedbom sekvenci gena *ompK36* u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883 pronađene su tri velike lezije kod svih sekvenciranih izolata. Kod svih izolata pronađene su insercije 3 nukleotida na dva mjesta u genu c.548_549insTCT (unutar L4 omče proteina OmpK36) i c.687_688insAAG, te delecija 21 nukleotida unutar L6 omče proteina OmpK36 (c.804_824delICGGCAACGGAGAATCTGATTC).

Kod 47,8% izolata detektirana je insercija 6 nukleotida (c.405_406insGGCGAC) koji kodiraju za aminokiseline glicin (Gly, G) i aspartat (Asp, D) unutar L3 omče proteina OmpK36, takozvana GD insercija. 40% izolata iz ove skupine imalo je smanjenu ekspresiju gena *ompK36* u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883, dok je 60% izolata imalo pojačanu ekspresiju gena *ompK36*.

Ekspresija gena *ompK36* bila je značajno smanjena kod 50% izolata bez GD insercije, dok je bila pojačana u izolata bez GD insercije koji imaju točkastu mutaciju (c.416C→A) koja na razini proteinske sekvence dovodi do zamijene serina tirozinom.

Kod 13,6% izolata (izolati 159/E, 189/E i 190/E) prisutna je insercija IS5 elementa veličine 1203 pb (c.821_822insIS5). Izolati 159/E, 189/E i 190/E nemaju insercije aminokiselina glicin i aspartat (c.405_405insGGCGAC), ali imaju insercije 3 nukleotida na dva mjesta u genu c.548_549insTCT (unutar L4 omče proteina OmpK36) i c.687_688insAAG. 66.7% izolata s IS5 insercijom imalo je sniženu ekspresiju gena *ompK36* u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883.

Kod izolata 11/E došlo je do insercije 2 nukleotida između pozicija 194 i 195 (c.194_195insCC), te insercije 1 nukleotida između pozicija 213 i 214 (c.213_214insA) i javlja se stop kodon (5'-TGA-3').

Kod izolata 122/E zbog insercije 1 nukleotida između pozicija 861 i 862 dolazi do pomaka okvira čitanja (c.861_862insT) i do preuranjene terminacije translacije, stop kodon (5'-TAA-3') na poziciji 920-923.

Kod izolata 159/E također dolazi do preuranjene terminacije translacije zbog točkaste mutacije na 951. poziciji (c.951C→T) i nastaje stop kodon (5'-TAG-3').

Kod sva tri izolata sa stop kodonom izmjerena je smanjena ekspresija gena *ompK36* u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883.

Izolat 73/E nije bio uspješno umnožen lančanom reakcijom polimerazom i nije detektiran gen *ompK36* (Slika 7.), stoga gen *ompK36* ovog izolata nije bio sekvenciran.

Značajno povećana ekspresija oba gena, *ompK35* i *ompK36*, detektirana je u 13% izolata (izolati 375/E, 377/E, 397/E). Značajno smanjenu ekspresiju oba gena, *ompK35* i *ompK36*, je pokazalo 39,1% izolata (izolati 73/E, 90/E, 96/E, 109/E, 122/E, 130/E, 151/E,

159/E, 160/E). 21,7% izolata je pokazalo značajno povećanu ekspresiju jednog gena i značajno smanjenje ekspresije drugog gena, svi izolati su imali značajno pojačanu ekspresiju gena *ompK36*, te značajno smanjenu ekspresiju gena *ompK35* (osim izolata 276/E koji je imao znatno pojačanu ekspresiju gena *ompK35* i znatno smanjenu ekspresiju gena *ompK36*) (Tablica 8.).

U Tablici 9. su nabrojane točkaste mutacije prisutne u svim izolatima (osim ako nije drugačije napomenuto), te promjene na razini proteinske sekvence koje izazivaju.

Tablica 9. Popis točkastih mutacija detektiranih sekvenciranjem kliničkih izolata *K. pneumoniae*

Pozicija na DNA sekvenci u odnosu na sekvencu ATCC 13883	Mutacija na razini DNA	Mutacija na razini proteina
416.*	C→A	S→Y
572.	G→A	G→T
599.	T→A	F→Y
655.	C→A	H→N
667.	A→C	N→L
668.	A→T	
669.	C→T	
685.	C→A	R→S
687.	T→C	
692.	A→C	D→A
693.	T→A	
694.	A→C	K→L
695.	A→T	
696.	A→G	
799.	T→G	F→A
800.	T→C	
802.	A→G	S→G
826.	A→T	I→S
827.	T→C	
828.	T→C	
829.	A→C	S→L
830.	G→T	
831.	C→G	
934.	A→C	I→L
936.	C→G	
958.	C→A	L→I
960.	G→C	
1028.**	A→T	K→I
1047.	A→C	E→D
1051.	G→A	D→S
1052.	A→G	
1053.	T→C	
1061.	G→A	R→H
1062.	T→C	
1063.	C→A	R→N
1064.	G→A	

*mutacija prisutna samo kod izolata 140/E, 340/E i 381/E

** mutacija prisutna samo kod izolata 340/E

4.RASPRAVA

U ovom je radu provedeno istraživanje na 23 klinička izolata *K. pneumoniae* smanjene osjetljivosti na ertapenem prikupljena na području grada Zagreba koji su pripadali klonskom tipu ST437. Klonski tip ST437 opisan u radu Jelić (2018.) je odgovoran za širenje CTX-M-15 u Hrvatske, te prije nije opisan na području Hrvatske i susjednih zemalja.

Analizirani izolati nisu proizvodili karbapenemaze, te su imali ESBL enzim CTX-M-15. Ertapenem rezistentni ESBL sojevi *K. pneumoniae* koji ne proizvode karbapenemaze su i prethodno prijavljivani (Wise i sur., 2018.).

Iako su svi klinički izolati uključeni u istraživanje imali funkcionalne, genski nepromjenjene porinske kanale OmpK35, ekspresija gena koji kodiraju taj kanal bila je značajno snižena u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883 ($p < 0.001$). Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da klinički izolati *K. pneumoniae* imaju smanjenu ekspresiju gena *ompK35* zbog okoliša u kojem se bakterija nalazi. *Klebsiella pneumoniae* je prisutna u ljudskim crijevima čiji uvjeti potiču ekspresiju porina OmpK36 (visoka osmolarnost i temperatura, nizak pH). Smanjena proizvodnja OmpK35 učestalo se opisuje u sojevima *K. pneumoniae* koji proizvode enzime ESBL. Smanjena ekspresija gena *ompK35* može se javiti i kao mehanizam zaštite od ulaska žučnih soli i većih antibiotika u bakteriju (Tsai i sur., 2011., El Din i sur., 2016.). Smanjena ekspresija gena *ompK35* može biti posljedica nekih promjena uzvodno od gena i zahtjeva daljnja ispitivanja (Hernandez-Alles i sur., 1999.). Prema Hernandez-Alles i sur. (1999.) bakterija uslijed selekcijskog pritiska zbog upotrebe antibiotika najčešće značajno smanji ili pak u potpunosti prestane proizvoditi porinski kanal koji omogućava unos antibiotika u stanicu. Većinom se prestaje proizvoditi porinski kanal s većom porom koji omogućava unos većih komponenti, u slučaju *K. pneumoniae* to bi bio OmpK35 (Hernandez-Alles i sur., 1999.). Doumith i sur. (2009.) su prilikom istraživanja ertapenem rezistentnih sojeva *K. pneumoniae* u Ujedinjenom Kraljevstvu naišli na izolate koji su imali normalnu sekvencu gena *ompK35*, qRT-PCR-om im je izmjerena razina ekspresije porina OmpK35 kao kod karbapenem osjetljivih sojeva, ali nisu uspjeli detektirati porine u vanjskoj membrani. Smatrali su da najvjerojatnije dolazi do pogreške tijekom translacije ili nekih promjena membrane koje ne omogućavaju umetanje porinskih kanala u membranu. Prijavljeni su i slični slučajevi kod *E. coli* kod kojih su porinski kanali OmpC i OmpF (homolozi OmpK35 i OmpK36) bili eksprimirani kod sojeva otpornih na tetraciklin, međutim na posttranslacijskoj razini su trimeri proteina eliminirani pomoću proteaze. Iako su bakterije imale normalnu sintezu porinskih kanala, proteini porinskih kanala su degradirani i nisu se mogli ugraditi u vanjsku membranu stanice (Viveiros i sur., 2007.). Potrebno je ispitati pristunost porinskih kanala u vanjskoj membrani izolata korištenih

u ovom radu kako bi provjerili postoji li i u ovom slučaju neka post-translacijska modifikacija koja utječe na ugradnju porinskih kanala u vanjsku membranu, te tako doprinosi smanjenju propusnosti i povećanoj otpornosti na antibiotike.

Analizom slijeda nukleotida u genu *ompK36* uočena je insercija koja je rezultirala umetanjem dvije aminokiseline (Gly i Asp, G i D) unutar omče 3 (L3). To se poklapa sa dosadašnjim istraživanjima provedenim na sojevima *K. pneumoniae* neosjetljivim na ertapenem. Naime, duplikacija GD se dogodila unutar omče 3 koja oblikuje otvor porinskog kanala OmpK36, te se proteže kroz kanal i tako regulira veličinu otvora porinskog kanala. Insercijom dvije aminokiseline unutar omče 3 dolazi do konstrikcije pore, čime se smanjuje veličina otvora i mogućnosti ulaska karbapenema, prvenstveno ertapenema, u bakterijsku stanicu (Garzia-Fernandez i sur., 2010.; Poulou i sur., 2013.; Wise i sur., 2018.). Prema Clancy i sur. (2013.) ova insercija je povezana s otpornosti na doripenem. Omča 3 je jako konzervirana regija i mutacije (insercija GD, SD ili TD aminokiselina) unutar konzervirane regije ne uzrokuju gubitak funkcije porinskog kanala, nego smanjenje propusnosti kanala i unos tvari u bakterijsku stanicu (Garzia-Fernandez i sur., 2010.; Poulou i sur., 2013.; Wise i sur., 2018.). Insercija GD unutar L3 proteina OmpK36 je učestala i dobro je opisana u znanstvenoj literaturi. Prema Fajardo-Lubian i sur. (2019.) GD insercija unutar L3 omče se smatra posljedicom konvergentne evolucije. Prilikom insercija unutar L3 omče glomaznije aminokiseline, kao što je treonin, uzrokuju veće začepljenje porinskog kanala OmpK36. Slične insercije unutar L3 omče su zabilježene i kod drugih vrsta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (Fajardo-Lubian i sur., 2019.).

U svim je analiziranim izolatima uočena insercija jedne aminokiseline unutar omče 4 (L4) koja je okrenuta okolišu stanice i potpomaže trimerizaciju monomera, te ga stabilizira. Wong i sur. (2019.) su dokazali da insercija odnosno delecija tri aminokiseline (LPS) unutar omče 4 (L4) nema utjecaja na otpornost kod *K. pneumoniae* koje kodiraju KPC-2. Prema Fajardo-Lubian i sur. (2019.) delecija 7 aminokiselina unutar omče 6 (L6) uzrokuje bolju prohodnost porina OmpK36 na krajnjem dijelu. Učinak insercije jedne aminokiseline unutar omče 4, isto kao delecija 7 aminokiselina unutar omče 6 (L6), na otpornost na ertapenem kod izolata *K. pneumoniae* koje ne ekspimiraju karbapenemaze za sada još nije istražen i zahtjeva daljnja istraživanja.

Gen *ompK36* nije detektiran lančanom reakcijom polimerazom kod izolata 73/E i stoga nije sekvenciran. Kod izolata 73/E ekspresija porinskog kanala OmpK36 je značajno smanjena u odnosu na kontrolni soj ATCC 13883. Pretpostavlja se da gen nije uspješno umnožen zbog mutacija koje su se dogodile u genu na mjestu vezanja početnica. Izolat 73/E je pokazao

značajno smanjenju ekspresiju oba porinska gena, te rezistentnost na ertapenem (MIC>32 mg/L).

Izolati 151/E, 189/E i 190/E nisu imali insercije GD unutar L3 omče, ali imaju insercije dvije aminokislone (c.548_549insTCT, c.687_688insAAG) i inserciju sekvence IS5 (c.821_822insIS5). Slučaj s identičnim mutacijama i insercijom IS5 elementa unutar gena *ompK36* je zabilježen na Tajvanu (Wu i sur., 2011.). IS5 element, dug oko 2 kb, uzrokuje insercijsku inaktivaciju gena *ompK36* tj. do nastanka nefunkcionalnog proteina OmpK36. Kao što je već spomenuto nefunkcionalni porinski kanal dovodi do smanjenog unosa tvari, ujedno i antibiotika, u stanicu. Obzirom da kod *K. pneumoniae* porin OmpK36 ima povećanu ekspresiju u odnosu na porin OmpK35 u ljudskom organizmu i važniji je za preživljavanje bakterije, bakterije deficitantne za porin OmpK36 imaju smanjeno preživljavanje i virulenciju, ali veću otpornost na ertapenem (Lee i sur., 2018.).

Izolati s prijevremenim stop kodonom unutar sekvence gena *ompK36* su imali značajno sniženu ekspresiju gena *ompK35* (jedino je izolat 11/E pokazivao pojačanu ekspresiju gena *ompK35*, ali ne značajno). Iako su ovi izolati visoko rezistentni na ertapenem, ne predstavljaju prijetnju za nastanak epidemija jer im je zbog smanjenje ekspresije gena *ompK35* i ne ekspimiranja proteina OmpK36 uvelike smanjena stopa virulencije i preživljavanja.

Istraživanja su utvrdila da sojevi koji proizvode ESBL ekspimiraju većinom OmpK36, a da ne ekspimiraju OmpK35. Wise i sur. (2018.) su otkrili da pojedini izolati *K. pneumoniae* s mutacijama u oba porinska gena nisu pokazivali visoku razinu otpornosti na ertapenem kao što je bilo očekivano, uz napomenu da se na razini gena ne može utvrditi apsolutna poveznica između nedostatka ekspresije oba porinska gena i visoke razine otpornosti na ertapenem.

Unatoč nepromijenjenom porinu OmpK35, svi su izolati bili rezistentni na ertapenem, što potvrđuju dosadašnja otkrića da je za otpornost na ertapenem, uz proizvodnju enzima ESBL ili AmpC enzima, važnija promjena unutar OmpK36 proteina koji je odgovoran za unos manjih, nabijenih molekula u bakterijsku stanicu (Lee i sur., 2018.). Fajardo-Lubian i sur. (2019.) su dokazali da je insercija GD unutar L3 omče podjednako učinkovita kao i potpuna delecija OmpK36 porina u smanjenju unosa velikih molekula antibiotika u bakterijsku stanicu.

Obzirom da su dosadašnji istraživani slučajevi imali najčešće mutacije u oba porinska gena, nisu ekspimirali porinske gene ili kombinacija ova dva slučaja, ti sojevi nisu predstavljali opasnost za nastanak epidemija. Dokazano je da ukoliko bakterija stvara nefunkcionalna oba porina da dolazi do smanjena preživljavanja bakterija i da im se smanjuje stopa virulencije (Tsai i sur., 2011.). Također Oteo i sur. (2014.) smatraju da karbapenem rezistenti sojevi koji stvaraju enzim ESBL unatoč otpornosti, zbog promjena unutar porinskih gena u uvjetima bez prisustva

antibiotika imaju smanjenu kompetitivnost i mogućnost nastanka epidemija. Klonski tip ST437 koji je u jednom lokusu varijant klonskog tipa ST258, koji ima veliki potencijal širenja, te unatoč promjenama u genima porinskih kanala prema Jeliću (2018.) ima klonalno širenje na području Hrvatske.

Usporedbom razine ekspresije gena porinskih kanala *K. pneumoniae* i MIC ertapenema nije utvrđena korelacija, iako su neka istraživanja dokazala povezanost između razine ekspresije porinskog kanala OmpK36 i otpornosti na antibiotike kod karbapenem rezistentnih *K. pneumoniae* koje proizvode karbapenemaze (Doumith i sur., 2016.). Analizom slijeda nukleotida gena *ompK35* i *ompK36* su pronađene promjene unutar gena *ompK36* koje utječu na njegovu mogućnost unosa tvari u bakterijsku stanicu. Izolati najvjerojatnije ne pokazuju očekivanu negativnu korelaciju jer proizvode izmijenjen porinski kanal OmpK36 smanjenog afiniteta za unos ertapenema u stanicu. To se podudara sa dosadašnjim istraživanjima prema kojima ESBL sojevi *K. pneumoniae*, bez gena koji kodiraju za karbapenemaze i imaju poremećenu ekspresiju porinskih kanala, te imaju smanjenu osjetljivost na karbapeneme. Zbog negativnog naboja i većih dimenzija ertapenem je karbapenem na čije antimikrobno djelovanje najviše utječu promjene u propusnosti vanjske membrane, stoga se uslijed mutacija porinskih gena mijenja i stopa otpornosti bakterije na ertapenem (Chung i sur., 2016.). Zbog smanjene propusnosti vanjske membrane je manja koncentracija antibiotika u bakterijskoj stanici, pa ESBL enzimi, unatoč slaboj hidrolitičkoj aktivnosti, uspješno inaktiviraju antibiotik (Leavitt i sur., 2009.). Budući da je vrlo dobro poznata uloga pojačane ekspresije enzima ESBL, poglavito CTX-M u *K. pneumoniae* rezistentnim na ertapenem bilo bi potrebno analizirati razinu ekspresije gena koji kodiraju enzime ESBL kako bi u potpunosti razjasnili doprinos ekspresije ovih gena otpornosti na ertapenem. Prema Santajit i Indrawattana (2016.) kod MDR *E. aerogenes* rezistentne na imipenem je dokazana poveznica između smanjene ekspresije porinskih kanala i hiperekspresije AcrAB efluks pumpi. Iako efluks pumpe kod *K. pneumoniae* imaju marginalnu ulogu u stjecanju otpornosti, trebalo bi analizirati razinu ekspresije ovih pumpi.

5.ZAKLJUČCI

- Zbog sve češće upotrebe antibiotika u liječenju, bakterije pod selektivnim pritiskom nakupljaju mutacije koje im omogućavaju smanjeno nakupljanje antibiotika u stanici. Bakterije nastoje ograničiti unos antibiotika kako se ne bi dosegla koncentracija potrebna za ispoljavanje antibakterijskog djelovanja.
- Za smanjenu otpornost na karbapeneme, odnosno za otpornost na ertapenem je i u ovom slučaju potvrđeno da je potrebna prisutnost ESBL ili AmpC enzima u bakteriji, te smanjena propusnost vanjske membrane.
- Niska raznolikost gena *ompK35* i *ompK36* daje dodatnu potvrdu da se radi o uspješnom širenju klonskog tipa ST437 *K. pneumoniae* na području Hrvatske.
- Korelacija između razine otpornosti na ertapenem i razine ekspresije porinskih gena nije dokazana jer ispitivani izolati imaju normalnu ekspresiju, ali nastaju mutirani porinskih kanali izmijenjenih svojstava.
- Klinički izolati obuhvaćeni u ovom radu ne proizvode karbapenemaze i imaju funkcionalne OmpK35 porinske kanale čime se ostavlja otvorena mogućnost liječenja infekcija uzrokovanih ovim sojevima pomoću ostalih lijekova iz skupine karbapenema.
- U ovom istraživanju su ispitivani sojevi koji imaju promijenjen porinski kanal OmpK36 (zbog insercija ili delecija, te točkastih mutacija) koji uz proizvodnju ESBL enzima doprinosi otpornosti na ertapenem, međutim ti isti sojevi imaju smanjenu ekspresiju divljeg tipa gena *ompK35* čime im se ne smanjuje značajno stopa preživljavanja unutar domaćina i virulencije. Uslijed pretjerane upotrebe antibiotika i stjecanja dodatnih gena za otpornost sojevi nalik ispitivanim izolatima predstavljaju potencijalnu opasnost za nastanak epidemije.

4. LITERATURA

1. Adler, A., Chmelnitsky, I., i Carmeli, Y. (2015): Effect of resistance mechanisms on the inoculum effect of carbapenem in *Klebsiella pneumoniae* isolates with borderline carbapenem resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 5014-5017.
2. Bonnet, R. (2004): Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1-14.
3. Calbo, E., i Garau, J. (2015): The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future microbiology*, 10(6), 1063-1075.
4. Chung, H. S., Yong, D., i Lee, M. (2016): Mechanisms of ertapenem resistance in Enterobacteriaceae isolates in a tertiary university hospital. *Journal of Investigative Medicine*, 64(5), 1042-1049.
5. Clancy, C. J., Chen, L., Hong, J. H., Cheng, S., Hao, B., Shields, R. K., Farrell, A. N., Doi, Y., Zhao, Y., Perlin, D. S., Nguyen, M. H., i Kreiswirth, B. N. (2013). Mutations of the ompK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), 5258-5265.
6. Curran, M. P., Simpson, D., i Perry, C. M. (2003): Ertapenem. *Drugs*, 63(17), 1855-1878.
7. Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M., i Woodford, N. (2009): Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 659-667.
8. El Din, A. A. M. N., Harfoush, R. A. H., Okasha, H. A. S., i Kholeif, D. A. E. S. (2016): Study of OmpK35 and OmpK36 expression in carbapenem resistant ESBL producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Advances in Microbiology*, 6(09), 662.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2013): Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (version 1.0).
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2020): Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (version 10.0).

11. Fajardo-Lubian, A., Zakour, N. L. B., Agyekum, A., Qi, Q., i Iredell, J. R. (2019): Host adaptation and convergent evolution increases antibiotic resistance without loss of virulence in a major human pathogen. *PLoS pathogens*, 15(3), e1007218.
12. Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D., i Saiman, L. (2003): Extended spectrum β lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of perinatology*, 23(6), 439-443.
13. Hirsch, E. B., i Tam, V. H. (2010): Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1119-1125.
14. Jelić, M. (2018): Mehanizmi rezistencije na antibiotike u Enterobakterija otpornih na karbapeneme. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
15. Kitchel, B., Rasheed, J. K., Endimiani, A., Hujer, A. M., Anderson, K. F., Bonomo, R. A., i Patel, J. B. (2010): Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4201-4207.
16. KONG, K. F., Schneper, L., i Mathee, K. (2010): Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1-36.
17. Landman, D., Bratu, S., i Quale, J. (2009): Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of medical microbiology*, 58(Pt 10), 1303.
18. Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Colodner, R., Ofek, I., Carmeli, Y., i Navon-Venezia, S. (2009): Ertapenem resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 47(4), 969-974.
19. Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., i Lee, S. H. (2016): Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology*, 7, 895.
20. Lee, J. J., Huang, Y. C., Hsiao, Y., Lee, C. H., Liu, C. S., i Chu, C. (2018): Insertion Sequence-Dependent OmpK36 Mutation Associated Ertapenem Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae*. *Advances in Microbiology*, 8(04), 253.
21. Martin, R. M., i Bachman, M. A. (2018): Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 4.

22. Meletis, G. (2016): Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, 3(1), 15-21.
23. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., i Carattoli, A. (2017): Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 252-275.
24. Nordmann, P., Cuzon, G., i Naas, T. (2009): The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 228-236.
25. Nordmann, P., Dortet, L., i Poirel, L. (2012): Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends in molecular medicine*, 18(5), 263-272.
26. Oteo, J., Miró, E., Pérez-Vázquez, M., i Navarro, F. (2014): Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future?. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 32, 17-23.
27. Paterson, D. L. (2006): Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American journal of infection control*, 34(5), S20-S28.
28. Pitout, J. D., Nordmann, P., i Poirel, L. (2015): Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 5873-5884.
29. Podschun, R., i Ullmann, U. (1998): Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589-603.
30. Santajit, S., i Indrawattana, N. (2016): Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016.
31. Seki, L. M., Pereira, P. S., Maria da Penha, A. H., Conceição, M. D. S., Marques, E. A., Porto, C. O., Colnago, E. M., Alves, F., Gomes, D., Assef, A. P., Asensi, M. D., i Samuelsen, Ø. (2011): Molecular epidemiology of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(2), 274-277.
32. Sugawara, E., Kojima, S., i Nikaido, H. (2016): Klebsiella pneumoniae major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their Escherichia coli homologs OmpF and OmpC. *Journal of bacteriology*, 198(23), 3200-3208.
33. Tsai, Y. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, J. H., Chang, F. Y., Chen, T. L., i Siu, L. K. (2011): Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play

- roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), 1485-1493.
34. Tzouveleki, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., i Daikos, G. L. (2012): Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 682-707.
 35. Viveiros, Miguel, i sur. (2007): Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PloS one* 2.4.
 36. Wang, G., Huang, T., Surendraiah, P. K. M., Wang, K., Komal, R., Zhuge, J., Chern, C. R., Kryszuk, A. A., King, C., i Wormser, G. P. (2013): CTX-M β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Suburban New York City, New York, USA. *Emerging infectious diseases*, 19(11), 1803.
 37. Wise, M. G., Horvath, E., Young, K., Sahm, D. F., i Kazmierczak, K. M. (2018): Global survey of *Klebsiella pneumoniae* major porins from ertapenem non-susceptible isolates lacking carbapenemases. *Journal of medical microbiology*, 67(3), 289-295.
 38. Wong, J. L., Romano, M., Kerry, L. E., Kwong, H. S., Low, W. W., Brett, S. J., Clements, A., Beis, K., i Frankel, G. (2019): OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
 39. Woodford, N., Dallow, J. W., Hill, R. L., Palepou, M. F. I., Pike, R., Ward, M. E., Warner, M., i Livermore, D. M. (2007): Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *International journal of antimicrobial agents*, 29(4), 456-459.
 40. Wu, J. J., Wang, L. R., Liu, Y. F., Chen, H. M., i Yan, J. J. (2011): Prevalence and characteristics of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Taiwanese university hospital. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 259-266.

5. ŽIVOTOPIS

Opći podaci:

- Ime i prezime: Mia Pejković
- Datum i mjesto rođenja: 29.9.1994. u Splitu
- Adresa stanovanja: Hrvatskih branitelja 56, 212 55 Zadvarje
- Telefon: +385 (99) 8574298
- E-mail: miapejkovic369@gmail.com

Obrazovanje:

- Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, sveučilišni diplomski studij molekularna biologija, 2016.-2020.
- “Jagiellonian University” Krakow, Poljska, studentska mobilnost u sklopu Erasmus+ programa, 2018.-2019.
- Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, sveučilišni preddiplomski studij biologija, 2013.-2016.
- Srednja škola „Jure Kaštelan“, smjer: opća gimnazija, 2009.-2013.
- Osnovna škola „Dr. Fra Karlo Balić“ u Šestanovcu, 2001.-2009.

Posebna znanja i vještine:

- Znanje svjetskih jezika: engleski (aktivno), talijanski (pasivno)
- Poznavanje rada na računalu: Word, Excel, Power Point, Internet
- Položen vozački ispit B kategorije