

Mehanizmi rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*

Duvančić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:568591>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tea Duvančić

Mehanizmi rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za bakteriologiju, bolničke infekcije i sterilizaciju, Zavoda za kliničku mikrobiologiju u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, pod vodstvom prof. dr. sc. Arjane Tambić Andrašević, znanstvene savjetnice i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem mentoricama prof. Arjani Tambić Andrašević i prof. Jasni Hrenović na pruženom vodstvu i prenesenom znanju.

Zahvaljujem dr. sc. Marku Jeliću na pruženoj pomoći pri provedbi eksperimenta.

Zahvaljujem prof. Damjanu Franjeviću na svim pruženim prilikama, povjerenju i pomoći tijekom studija.

Hvala mojoj obitelji, posebno mami Tini, na podršci ne samo tijekom studija, nego u svemu čega sam se prihvatila.

Hvala prijateljima i kolegama sa studija, posebno Ani, za sve sate druženja i zajedničkog učenja. Posljednjih nekoliko godina ne bi bile iste bez vas.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

MEHANIZMI REZISTENCIJE NA KOLISTIN U KLINIČKIH IZOLATA

Klebsiella pneumoniae

Tea Duvančić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Klebsiella pneumoniae, gram-negativna bakterija iz porodice Enterobacterales, ljudski je patogen koji uzrokuje širok spektar infekcija. Pojava rezistencije na karbapeneme, visoko djelotvornu skupinu antibiotika, u enterobakterija uvjetovala je sve češću upotrebu kolistina kao antibiotika zadnje linije obrane. Upravo je zato pojava sojeva *K. pneumoniae* rezistentnih na kolistin od velikog kliničkog značaja. Cilj ovog istraživanja bio je otkriti mehanizme rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *K. pneumoniae* prikupljenih u Zagrebu. Metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu ispitana je osjetljivost izolata *K. pneumoniae* na kolistin i utvrđeno je kako je svih 12 izolata rezistentno na taj antibiotik. Metodama lančane reakcije polimerazom i gel elektroforezom ispitana je prisutnost plazmidnih gena *mcr* i kromosomskih gena *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* i *phoQ* te je utvrđeno kako je rezistencija na kolistin u ispitivanih izolata posljedica mutacija u genu *mgrB*. Sekvenciranjem gena *mgrB* otkriveno je kako je rezistencija uzrokovana dvjema vrstama mutacija: insercijom elementa IS1 unutar regulatorne regije gena te točkastom mutacijom u samom genu. Metodom ERIC-PCR ustanovljeno je da svi ispitivani izolati pripadaju dvama bakterijskim sojevima, što je u skladu s očekivanjima budući da se u svih dvanaest pacijenata radilo o bolničkoj infekciji.

(25 stranica, 9 slika, 5 tablica, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: bakterije, kolistin, rezistencija na antibiotike, gen *mgrB*

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

Suvoditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof., Dr. sc. Damjan Franjević, prof., Dr. sc. Petra Korać, prof.

Rad prihvaćen: 13.2.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

MECHANISMS OF COLISTIN RESISTANCE IN CLINICAL ISOLATES OF

Klebsiella pneumoniae

Tea Duvančić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Klebsiella pneumoniae, a gram-negative bacterium of the family Enterobacterales, is a human pathogen which causes a broad spectrum of infections. Occurrence of resistance to carbapenems, a highly-effective group of antibiotics, in enterobacteria led to an increase in usage of colistin as a last-resort antibiotic. That is why occurrence of colistin-resistant strains of *K. pneumoniae* is of great clinical significance. The aim of this experiment was to determine the mechanisms of resistance to colistin in clinical isolates of *K. pneumoniae* collected in Zagreb. Sensitivity of the isolates to colistin was determined by microdilution in Mueller-Hinton broth, which showed all 12 of the isolates were resistant to the antibiotic. PCR and gel electrophoresis were used to test the presence of plasmid *mcr* genes and chromosomal *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* and *phoQ* genes and showed the resistance to colistin was the result of mutations in *mgrB* gene. Sequencing of *mgrB* gene showed the resistance was caused by two types of mutations: insertion of IS1 element in the regulatory region of the gene and point mutation within the gene. ERIC-PCR analysis showed all the isolates belong to two bacterial strains, which makes sense since all patients acquired the infection in a hospital.

(25 pages, 9 figures, 5 tables, 27 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: bacteria, colistin, antibiotic resistance, *mgrB* gene

Supervisor: Dr.PhD Arjana Tambić Andrašević, prof.

Cosupervisor: PhD Jasna Hrenović, prof.

Reviewers: PhD Jasna Hrenović, prof., PhD Damjan Franjević, prof., PhD Petra Korać, prof.

Thesis accepted: February 13th 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Opća svojstva bakterije <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.2 Antibiotik kolistin.....	1
1.2.1 Struktura i mehanizam djelovanja kolistina	1
1.2.2 Upotreba kolistina	2
1.3 Rezistencija bakterija na antibiotike.....	2
1.3.1 Mehanizmi rezistencije na antibiotike.....	3
1.4 Mehanizmi rezistencije na kolistin u <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1.4.1 Rezistencija na kolistin posredovana kromosomskim genima	4
1.4.2 Rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima.....	5
1.5 Cilj istraživanja.....	6
2. MATERIJALI I METODE	7
2.1 Sojevi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.2 Detalji o pacijentima	7
2.3 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu	7
2.5 Lančana reakcija polimerazom s početnicama za plazmidne gene <i>mcr</i> i gel elektroforeza	8
2.6 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena	10
2.6.1 Lančana reakcija polimerazom s početnicama za umnažanje kromosomskih gena	10
2.6.2 Pročišćavanje umnožene DNA i sekvenciranje gena <i>mgrB</i>	11
2.7 Molekularno-epidemiološka analiza lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za enterobakterijske ponavljajuće sekvence u konsenzusu (ERIC-PCR)	12
3. REZULTATI.....	14
3.1 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu	14
3.2 Ispitivanje prisutnosti plazmidnih gena <i>mcr</i>	15
3.3 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena	16
3.3.1 Izolacija DNA i lančana reakcija polimerazom.....	16
3.3.2 Sekvenciranje gena <i>mgrB</i>	18
3.4 Molekularno-epidemiološka analiza lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za enterobakterijske ponavljajuće sekvence u konsenzusu (ERIC-PCR)	19
4. RASPRAVA.....	21
4.1 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu	21
4.2 Ispitivanje prisutnosti rezistencije na kolistin posredovane plazmidnim genima <i>mcr</i>	21
4.3 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena	22
4.4 Molekularno-epidemiološka analiza	22
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA.....	25
7. ŽIVOTOPIS	27

1. UVOD

1.1 Opća svojstva bakterije *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je gram-negativna bakterija iz porodice Enterobacterales. Prvi ju je opisao Carl Friedlander krajem 19. stoljeća. Radi se o kapsulogenoj, nepokretnoj bakteriji koja se nalazi u okolišu, između ostalog u tlima i površinskim vodama (Paczosa i Mecsas 2016).

K. pneumoniae uzrokuje niz humanih i animalnih infekcija. Kolonizira mukozne površine u ljudskom tijelu, poput gastrointestinalnog i respiratornog trakta, odakle potom može ući u druga tkiva i uzrokovati teške infekcije (Paczosa i Mecsas 2016). Virulencija *K. pneumoniae* posredovana je s više faktora. Najvažniji faktor virulencije je polisaharidna kapsula koja bakteriji omogućuje izbjegavanje opsonofagocitoze od strane domaćina. Drugi su bitan faktor virulencije lipopolisaharidi koji oblažu vanjsku površinu *K. pneumoniae*, kao i drugih gram-negativnih bakterija. Kada domaćinski organizam osjeti prisutnost lipopolisaharida, aktivira se upalni odgovor za koji se pokazalo da je ključan korak u kaskadi procesa koji rezultiraju sepsom i septičnim šokom. Neki od ostalih faktora virulencije uključuju fimbrije, koje omogućuju prihvaćanje za domaćinsku stanicu, te siderofore, koji uzimaju željezo od domaćina i omogućuju širenje infekcije (Ashurst i Dawson 2018).

Ljudi su primarni rezervoar *K. pneumoniae*. Smatra se da 5% do 38% opće populacije nosi bakteriju u stolici te 1% do 6% u nazofarinksu. Veće stope kolonizacije zabilježene su u ljudi koji su porijeklom iz Kine, kroničnih alkoholičara te hospitaliziranih pacijenata. Walter i sur. (2018) ustanovili su da postotak hospitaliziranih pacijenata kojima je u stolici pronađena *K. pneumoniae* raste do čak 77%, najvjerojatnije zbog velikih količina antibiotika koje primaju (Ashurst i Dawson 2018).

1.2 Antibiotik kolistin

Kolistin, također znan pod imenom polimiksin E, je polipeptidni antibiotik iz skupine polimiksina, antibiotika koji djeluju protiv gram-negativnih bakterija. Prvi je put izoliran 1947. godine iz bakterije tla *Paenibacillus polymyxa* (Biswas i sur. 2012).

1.2.1 Struktura i mehanizam djelovanja kolistina

Kolistin je polikationski polipeptid s hidrofilnom i lipofilnom domenom (Caniaux i sur. 2016). Građen je od cikličkog heptapeptida, koji ima tripeptidni bočni lanac acetiliran na N-terminusu. Na molekularnoj razini nije homogen, već se sastoji od smjese cikličkih polipeptida A i B, koji se razlikuju u strukturi bočnog lanca. Kolistin A u sastavu ima 6-metiloktansku kiselinu, a kolistin B 6-metilheptansku kiselinu (Poirel i sur. 2017).

Kolistin djeluje na vanjsku membranu gram-negativnih bakterija. Zbog elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijene α,γ -diaminobutiratske kiseline bočnog lanca antibiotika i negativno nabijenih fosfatnih grupa lipida A bakterijske vanjske membrane dolazi do uklanjanja magnezijevih i kalcijevih iona membranskih lipida (Poirel i sur. 2017). Gubitak divalentnih kationa narušava strukturni integritet membrane, što rezultira curenjem sadržaja i staničnom smrću (Biswas i sur. 2012).

1.2.2 Upotreba kolistina

Kolistin se u mnogim zemljama diljem svijeta upotrebljava u agrikulturi za uzgoj i kontrolu infekcija u svinja i stoke (Ventola 2015). Njegova je upotreba u ljudskoj medicini do nedavno bila ograničena zbog negativnih nuspojava, te se upotrebljavao kao antibiotik zadnje linije obrane (Caniaux i sur. 2016).

Upotreba kolistina za liječenje infekcija u ljudi uzrokovanih gram-negativnim bakterijama započela je 1959. godine. Zbog njegove neuro- i nefrotoksičnosti gotovo je potpuno zamijenjen aminoglikozidnim antibioticima već u sedamdesetim godinama dvadesetog stoljeća (Biswas i sur. 2012). Klinički značaj kolistina ponovno je porastao od pojave višestruko rezistentnih enterobakterija, posebice onih rezistentnih na karbapeneme. Karbapenemi su klasa antibiotika širokog spektra djelovanja koji se koriste za liječenje teških infekcija. Sve veća prevalencija višestruko rezistentnih bakterija uvjetovala je pronalaženje novih antibiotika. Kako nisu pronađene zadovoljavajuće alternative u smislu novih antibiotika, mikrobiolozi su se vratili upotrebi kolistina (Loho i Dharmayanti 2015).

Trenutno su dostupna dva oblika kolistina: kolistin sulfat i kolistin metansulfonat (CMS). Kolistin sulfat može se aplicirati oralno kao tableta i sirup ili kao vodena otopina za oči i uši. Kolistin metansulfonat koristi se parenteralno. Nastaje u reakciji kolistina, formaldehida i natrijevog bisulfita. U vodenom mediju te *in vivo* u tjelesnim tekućinama pretvara se u biološki aktivan kolistin (Biswas i sur. 2012).

1.3 Rezistencija bakterija na antibiotike

Pojam rezistencije na antibiotike podrazumijeva sposobnost mikroorganizma da preživi učinak antibiotika. Razina rezistencije rutinski se izražava vrijednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, od eng. minimal inhibitory concentration), tj. minimalne koncentracije antibiotika koja izaziva vidljivu inhibiciju rasta bakterija (Iredel i sur. 2016).

Razlikujemo dva osnovna tipa rezistencije na antibiotike: intrinzičnu i stečenu. Intrinzična rezistencija je ona prirodna bakteriji, koja se razvila kao posljedica generalnih

adaptivnih procesa koji nisu nužno vezani uz određenu klasu antibiotika. Primjer tog tipa rezistencije su vanjska membrana gram-negativnih bakterija, nepostojanje transportera za unos molekula antibiotika te prisutnost gena odgovornih za rezistenciju na antibakterijsku tvar koju proizvodi sama bakterija. Stečena rezistencija je posljedica selektivnog pritiska, zbog kojeg su bakterijske populacije prethodno osjetljive na određeni antibiotik razvile rezistenciju na njega. Taj tip rezistencije rezultat je promjena u bakterijskom genomu, bilo da se radi o mutaciji ili o vertikalnom prijenosu na stanice kćeri (Bockstael i Van Aerschot 2009). Dva osnovna mehanizma kojima bakterije stječu rezistenciju na antibiotike su mutacije u genu ili genima koji su uključeni u put djelovanja antimikrobne tvari te horizontalni prijenos gena, tj. stjecanje strane DNA koja nosi determinante rezistencije (Martinez 2014).

Sama pojava rezistencije nije posljedica upotrebe antibiotika, već se radi o prirodnom mehanizmu kojim se bakterije štite od antimikrobnih tvari iz okoliša. Sve učestalija primjena antibiotika u medicini i agrikulturi u zadnjih nekoliko desetljeća dovela je do porasta broja rezistentnih bakterija (Ventola 2015). Problem rezistencije u prošlosti se rješavao uvođenjem novih antibiotika. No, kako je prevalencija rezistentnih bakterija sve veća, a broj novih antibiotika sve manji, problem rezistencije postaje od velikog značaja. S medicinskog gledišta predstavlja prijetnju ljudskom zdravlju na dvije razine: direktno utječe na uspješnost liječenja infekcija i može ugroziti medicinske postupke koji zahtijevaju imunosupresiju, poput transplantacija, te medicinske postupke kod kojih je nužna upotreba antibiotika radi sprječavanja infekcija, poput zahtjevnih operacija i kemoterapije (Martinez 2014). Iako se rezistencija ne može iskorijeniti, moguće je usporiti porast broja rezistentnih bakterija pravilnom upotrebom antibiotika, tj. izbjegavanjem njihove prekomjerne i bespotrebne aplikacije (Munita i Arias 2016).

1.3.1 Mehanizmi rezistencije na antibiotike

Rezistencija na neku antimikrobnu tvar može se postići kroz više biokemijskih puteva. Jedna bakterijska stanica istovremeno može posjedovati nekoliko različitih mehanizama rezistencije, pri čemu može doći do aditivnog efekta i često veće razine rezistencije. Unatoč tome, bakterije „preferiraju“ određeni mehanizam obrane. Tako je npr. glavni mehanizam rezistencije na β -laktame u gram-negativnih bakterija proizvodnja β -laktamaza, dok gram-pozitivne bakterije preferiraju modifikaciju ciljnih mjesta te skupine antibiotika (Munita i Arias 2016).

Mehanizmi rezistencije mogu se podijeliti u tri osnovne skupine: modifikacija molekule antibiotika, promjene u prometu antibiotika u stanici i modifikacije ciljnog mjesta. Najčešći i

najefikasniji mehanizam je proizvodnja enzima koji inaktiviraju antibiotik katalizirajući adiciju različitih kemijskih grupa ili uništavajući molekulu antibiotika. Mehanizmi koji djeluju na promet antibiotika u stanici utječu na unos ili izbacivanje molekula iz stanice. Rezistencija tako može proizlaziti iz smanjene propusnosti bakterijske membrane ili veće ekspresije membranskih pumpi koje izbacuju molekule antibiotika. Česta je strategija i modifikacija ciljnog mjesta antibiotika. Te modifikacije uključuju točkaste mutacije gena koji kodira ciljno mjesto, enzimske alteracije veznog mjesta i zaobilaženje izvornog ciljnog mjesta. Ukoliko je ciljno mjesto izmijenjeno, antibiotik se neće moći vezati ni potaknuti kaskadu reakcija koje bi u konačnici dovele do stanične smrti (Munita i Arias 2016).

1.4 Mehanizmi rezistencije na kolistin u *Klebsiella pneumoniae*

Soj *K. pneumoniae* definiramo kao rezistentan na kolistin ukoliko je minimalna inhibitorna koncentracija kolistina veća od 2 mg/L (EUCAST 2019). Rezistencija na kolistin najčešće je posredovana kromosomskim genima, no u zadnje je vrijeme sve češća i ona posredovana plazmidnim genima, koja je ujedno i od većeg kliničkog značaja (Poirel i sur. 2017).

1.4.1 Rezistencija na kolistin posredovana kromosomskim genima

Mehanizmi rezistencije na kolistin još nisu u potpunosti razjašnjeni, no identificirano je nekoliko molekularnih mehanizama. Najčešće se radi o modifikaciji lipopolisaharida bakterijske vanjske membrane, a većina mehanizama posredovana je upravo kromosomskim genima. Dodatak kationskih grupa, poput 4-amino-4-deoksi-L-arabinoze (L-Ara4N) i fosfoetanolamina (pEtN), lipopolisaharidima bakterijske membrane stječe se rezistencija na kolistin (Poirel i sur. 2017).

Geni *pmrA* i *pmrB* kodiraju PmrAB dvokomponentni sustav. PmrB je protein s tirozin-kinaznom aktivnošću kojeg aktiviraju razni podražaji iz okoliša, poput iona željeza i aluminija i niskog pH. Aktivirani PmrB fosforilacijom aktivira PmrA, koji zatim aktivira transkripciju operona *pmrCAB* i *pmrHFIJKLM* te gena *pmrE*, što rezultira modifikacijom lipopolisaharida bakterijske membrane. PmrAB dvokomponentni sustav normalno se aktivira pri fagocitozi bakterija od strane makrofaga, što omogućuje preživljenje bakterijske stanice. Identificirane su mutacije u genima *pmrA* i *pmrB* odgovorne za pojavu rezistencije u *K. pneumoniae*. Te mutacije rezultiraju konstitutivnom aktivacijom PmrAB dvokomponentnog sustava i posljedičnom aktivacijom operona *pmrCAB* i *pmrHFIJKLM* i gena *pmrE*, te sintezom pEtN i L-Ara4N i njihovim transportom do lipida A bakterijske vanjske membrane (Poirel i sur. 2017).

Geni *phoP* i *phoQ* kodiraju PhoPQ dvokomponentni sustav, koji također u bakterijskim stanicama divljeg tipa pomaže preživljavanje fagocitoze od strane makrofaga. Operon *phoPQ* kodira dva proteina: regulatorni protein PhoP i senzorni protein kinazu PhoQ. Kinazu PhoQ aktiviraju razni okolišni podražaji, poput niskog pH, niske koncentracije magnezijevih iona te fagosoma. PhoPQ dvokomponentni sustav omogućuje ekspresiju gena koji kodiraju magnezijeve transportere, enzima koji modificiraju lipopolisaharide i enzima koji smanjuju stanični stres uzrokovan niskim pH, te tako omogućuje stanici preživljavanje takvih nepovoljnih uvjeta. PhoQ je protein s tirozin-kinaznom aktivnošću koji fosforilira i aktivira protein PhoP. Aktivirani PhoP aktivira transkripciju operona *pmrHFIIKLM*, koji je uključen u adiciju L-Ara4N lipopolisaharidima. PhoP također može aktivirati PmrA, što rezultira adicijom pEtN lipopolisaharidima. Mutacije gena *phoP* i *phoQ* rezultiraju konstitutivnom aktivacijom PhoPQ dvokomponentnog sustava i posljedičnom aktivacijom operona *pmrHFIIKLM* te adicijom L-Ara4N lipidu A (Poirel i sur. 2017).

Gen *mgrB* kodira mali transmembranski protein MgrB, negativni regulator PhoPQ dvokomponentnog sustava. Aktivacija PhoP rezultira pojačanom ekspresijom gena *mgrB* i sintezom proteina MgrB, što reprimira ekspresiju gena *phoQ* i negativno regulira PhoPQ dvokomponentni sustav. Inaktivacija gena *mgrB* vodi do prekomjerne ekspresije operona *phoPQ*, aktivacije operona *pmrHFIIKLM*, sinteze L-Ara4N i posljedične rezistencije na kolistin. Rezistencija na kolistin u *K. pneumoniae* može biti posljedica missense i nonsense mutacija gena *mgrB*, koje rezultiraju aminokiselinskim supstitucijama odnosno skraćenim proteinom MgrB, delecija i insercija kraćih sekvenci gena i delecije cijelog lokusa *mgrB*. Jayol i sur. (2016) otkrili su da rezistentni fenotip također može biti posljedica transpozicije gena koji kodiraju β -laktamaze širokog spektra ili karbapenemaze, što dovodi do disrupcije kromosomskog gena *mgrB*. Unatoč visokoj homologiji sekvenci gena *mgrB* unutar porodice Enterobacterales, disrupcija gena nije identificirana kao uzrok rezistentnog fenotipa ni u jednom drugom rodu osim u rodu *Klebsiella* (Poirel i sur. 2017).

1.4.2 Rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima

Rezistencija na kolistin posredovana je plazmidnim genima *mcr*, a prvi je put opisana u izolata *Escherichia coli* i *K. pneumoniae* prikupljenih u Kini između 2011. i 2014. godine. Proteini kodirani genima *mcr* pripadaju obitelji fosfoetanolamin transferaza koje kataliziraju adiciju fosfoetanolamina lipidu A bakterijske membrane, čime se mijenja njen ukupni naboj (Poirel i sur. 2017). Plazmidni smještaj gena *mcr* od većeg je epidemiološkog značaja jer omogućuje horizontalno širenje gena rezistencije na kolistin među višestruko rezistentnim

uzročnicima bolničkih infekcija čime bi se dodatno suzio ionako smanjen izbor antibiotika dostupnih za liječenje (Granata i Petrosillo 2017).

Dosad je opisano više gena *mcr*, od kojih su najviše istraženi *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* i *mcr-4*, na kojima će biti naglasak u ovom radu. Proizvodnja proteina MCR-1 u *E. coli* rezultira porastom minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za 4 do 8 puta, te je sama dovoljna za pojavu rezistencije čak i ako nisu prisutni dodatni mehanizmi rezistencije. Osim što posreduje rezistenciji na kolistin, prisutnost proteina MCR-1 zaslužna je i za rezistenciju na lizozim. Struktura proteina MCR-1 razriješena je na rezoluciji od 1,32-Å. Radi se o metaloenzimu koji u aktivnom mjestu ima četiri cinkova iona. Vezna mjesta za lipid A i supstrate nisu vidljiva u strukturi katalitičke domene, što upućuje na njihovu prisutnost u membranskoj domeni (Poirel i sur. 2017).

Prvi *mcr-1* pozitivan soj prikupljen je iz pilića u Kini prije tridesetak godina, kada je počela upotreba kolistina za uzgoj životinja za hranu. Nakon inicijalnog nalaza, gen *mcr-1* je pronađen diljem svijeta u okolišu, povrću, mesu, životinjama i ljudima. Pretpostavlja se da su životinje, pogotovo svinje i stoka, glavni izvor bakterijskih sojeva koji proizvode MCR-1, a u prilog toj hipotezi idu snažan selektivni pritisak u veterini te pojava rezistencije posredovane genom *mcr-1* u izolatima prikupljenih iz životinjskih uzoraka diljem svijeta (Poirel i sur. 2017).

Gen *mcr-1* može se prenositi raznim plazmidima, čija veličina varira od 58 do 251 kb. Neki plazmidi koji nose gen *mcr-1* nose i druge gene odgovorne za rezistenciju na klinički značajne antibiotike, poput β-laktama, aminoglikozida, tetraciklina i fosfomicina. Smještaj gena *mcr-1* na takvim plazmidima, nositeljima više determinanti rezistencije, iznimno je zabrinjavajuć, jer upotreba drugih antibiotika tako može posredovati u koselekciji i širenju izolata koji nose *mcr-1* (Poirel i sur. 2017). Thanh i sur. (2016) opisali su gen *mcr-1* u izolatu *Shigella sonnei*, koji je bio prekinut duplikacijom od 22 pb. Ti su izolati *S. sonnei* bili osjetljivi na kolistin. Pod selektivnim pritiskom, tj. dodatkom kolistina, došlo je do delecije jedne kopije sekvence od 22 pb i ispoljavanja rezistentnog fenotipa. Postojanje takvog deaktiviranog oblika gena *mcr-1* sugerira negativan učinak aktivnog gena *mcr-1* na fitness.

1.5 Cilj istraživanja

Kako zasad još nisu provedena sustavna istraživanja o rezistenciji na kolistin u *K. pneumoniae* u Hrvatskoj, cilj istraživanja je utvrditi i objasniti mehanizme rezistencije na kolistin. Karakterizacija mehanizama rezistencije i analiza molekularne epidemiologije pružit će uvid u prisutnost ovog emergentnog bolničkog patogena u Republici Hrvatskoj.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Sojevi *Klebsiella pneumoniae*

Sve su analize i postupci provedeni na 12 kliničkih izolata *K. pneumoniae*, prikupljenih u periodu od 1. srpnja do 1. rujna 2018. godine u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, kod kojih je na Zavodu za kliničku mikrobiologiju utvrđena rezistencija na kolistin. Uzorci su označeni brojevima od 1 do 12, a oznake su dosljedno korištene za sve analize i postupke. Prije svakog postupka bakterijski su izolati nasađeni na krvni agar (5% konjska krv, „Blood agar base“, BioRad, SAD) te inkubirani na 37°C preko noći.

2.2 Detalji o pacijentima

Svih 12 kliničkih izolata *K. pneumoniae* prikupljeno je od pacijenata hospitaliziranih u Zagrebu. Brojevi pacijenata odgovaraju oznakama uzoraka 1-12. Pacijenti 1 i 12 hospitalizirani su u Kliničkoj bolnici Merkur, dok su pacijenti 2-11 hospitalizirani u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U svih se pacijenata radi o bolničkoj infekciji *K. pneumoniae*.

2.3 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu

Testiranje osjetljivosti na kolistin rađeno je sukladno EUCAST (2019) preporuci. Korištene su mikrotitarske pločice, koje su pripravljene prema Tablici 1. U stupac 1 pipetirano je 100 µL Mueller-Hinton bujona („Mueller Hinton Medium“, Becton Dickinson, Njemačka) bez antibiotika te je on služio kao negativna kontrola. U stupac 2 pipetirano je 50 µL CA-MH („Cation-Adjusted BBL™ Mueller Hinton II Broth“, Becton Dickinson, Njemačka) bez antibiotika. Stupac 3 ostavljen je prazan kako bi se kontrole odvojile od ispitivanih uzoraka. U stupce 4-12 dodano je po 50 µL Mueller-Hinton bujona s kolistinom („Colistin sulfate salt“, Sigma-Aldrich, Njemačka), konačnih koncentracija (mg/L) redom po stupcima: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 i 32.

Tablica 1. Shema pripreme mikrotitarske pločice za testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
c(kolistin) (mg/L)	CA-MH	CA-MH	Prazno	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
A	100µl bujon	50µl bujon	Prazno	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon
B	100µl bujon	50µl bujon	Prazno	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon	50µl bujon

Pripremljeno je po 5 mL suspenzije gustoće 0,5 McFarland svih 12 ispitivanih sojeva *K. pneumoniae* te kontrolnih sojeva NCTC (*E. coli* NCTC 13846) i ATCC (*E. coli* ATCC 25922). Gustoća suspenzija očitana je pomoću denzimata DEN-1B (Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo). Radne otopine svih sojeva pripremljene su dodatkom 50 µL pripremljenih bakterijskih suspenzija u 4950 µL Mueller-Hinton bujona. Otopine su vorteksirane prije pipetiranja.

Radne otopine bakterijskih sojeva nanošene su u duplikatima – svaki red mikrotitarske pločice predstavljao je jednu repliku. Pipetirano je po 50 µL otopine testiranog soja u stupce 2 (pozitivna kontrola) te 4 do 12. Sojevi NCTC i ATCC pripremljeni su na isti način, na zasebnoj mikrotitarskoj pločici. Mikrotitarske pločice inkubirane su u termostatu na 37°C tijekom 24h.

Za očitavanje testa mikrodilucije korišteno je ogledalo za povećanje slike. Pločice su smještene iznad ogledala te su od 4. do 12. stupca očitane vrijednosti u mg/L stupca u kojem je još zabilježen porast bakterijske kulture. Prvi stupac, tj. jažica u kojem se ne vidi porast bakterijskog soja odgovara vrijednosti MIC-a.

2.5 Lančana reakcija polimerazom s početnicama za plazmidne gene *mcr* i gel elektroforeza

Ispitivanje prisutnosti plazmidnih gena *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* i *mcr-4* provedeno je četirima lančanim reakcijama polimerazom te analizom produkata reakcije gel elektroforezom. Postupak je za sva 4 gena bio isti, ali su korišteni različiti parovi početnica.

DNA svih 12 kliničkih izolata *K. pneumoniae* poraslih na krvnom agaru izolirana je kuhanjem vodene suspenzije 10 minuta na 99°C uz trešnju (Thermomixer comfort, Eppendorf®, Njemačka) kako bi došlo do oslobađanja DNA iz stanice.

Reakcijska smjesa za svaki od 12 ispitivanih uzoraka pripremljena je miješanjem 6,61 µL vode, 1 µL 10 X „HotStart Buffer complete“ pufera (Jena Bioscience, Njemačka), 0,8 µL smjese deoksinukleozid-trifosfata („Geneamp® dNTP blend“, 2,5 mM svaki dNTP, Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,5 µL odgovarajućih početnica (Tablica 2), 0,09 µL HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka) te 1 µL uzorka DNA. Korištene su dvije negativne kontrole. U prvoj je umjesto izolirane bakterijske DNA dodan 1 µL vode (NK1), a u drugoj je dodan 1 µL DNA izolirane iz soja *K. pneumoniae* za koji je utvrđeno da je osjetljiv na kolistin (NK2). Lančana reakcija polimerazom provedena je na uređaju Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon inicijalne denaturacije (94°C, 90 s) slijedilo je 35 ciklusa umnažanja (20 s na 94°C, 25 s na 55°C, 45 s na 72°C), a finalna elongacija

provedena je na 72°C, 2 minute. Za reakcije su korišteni parovi početnica za umnažanje svakog pojedinog gena.

Tablica 2. Sekvence *forward* (F) i *reverse* (R) početnica za umnažanje gena *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* i *mcr-4* i veličine amplikona. Sekvence početnica preuzete su iz rada Haeili i sur. 2017.

Gen	Sekvenca početnice	Veličina amplikona (pb)
<i>mcr-1</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309
	R: CTTGGTCCGGTCTGTAGGG	
<i>mcr-2</i>	F: TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	567
	R: AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	
<i>mcr-3</i>	F: TTGGCACTGTATTTTGCATTT	542
	R: TTAACGAAATTGGCTGGAACA	
<i>mcr-4</i>	F: ATTGGGATAGTCGCCTTTTT	487
	R: TTACAGCCAGAATCATTATCA	

Umnožena DNA detektirana je horizontalnom gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu („Agarose“, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljenom u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-baza, 1% v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) s 0,1% volumnim udjelom Sybr Safe boje („Sybr® Safe“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Prije nanošenja na gel, svakom je uzorku dodano 1,6 µL boje za nanošenje („DNA Gel Loading Dye 6X“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Prisutnost plazmidnih gena *mcr-1* i *mcr-2* provjerena je na dvama odvojenim gelovima, na koje je u prvu jažicu nanoseno 5 µL markera („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), zatim po 9 µL uzoraka 1-12 te negativnih kontrola NK1 i NK2. Elektroforeza je provedena na 75V, 30 minuta. Prisutnost plazmidnih gena *mcr-3* i *mcr-4* provjerena je na istom gelu, na koji je redom nanoseno: 5 µL markera („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), po 9 µL uzoraka 1-12 te negativnih kontrola NK1 i NK2 iz reakcije za umnažanje gena *mcr-3*, 5 µL markera, po 9 µL uzoraka 1-12 te negativnih kontrola NK1 i NK2 iz reakcije za umnažanje gena *mcr-4*, te 5 µL markera. Elektroforeza je provedena na 100V, 45 minuta. Svi gelovi slikani su uređajem za vizualizaciju DNA pod UV-svjetlošću OmniDOC (Clever Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo).

2.6 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena

2.6.1 Lančana reakcija polimerazom s početnicama za umnažanje kromosomskih gena

Za ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena provedene su dvije lančane reakcije polimerazom. U prvoj su korištene početnice za umnažanje gena *pmrA* i *mgrB*, a u drugoj početnice za umnažanje gena *pmrB*, *phoP* i *phoQ*. Postupak je za obje reakcije bio isti.

DNA svih 12 uzoraka izolirana je pomoću QIAamp DNA Mini Kit-a (Qiagen, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Koncentracija DNA i čistoća, tj. $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$, izmjereni su spektrofotometrijski pomoću uređaja Biophotometer® (Eppendorf®, Njemačka). Uzorci su razrijeđeni vodom pročišćenom od nukleaza kako bi konačna koncentracija svakog uzorka iznosila 10 ng/ μ L.

Reakcijska smjesa za svaki od 12 ispitivanih uzoraka pripremljena je miješanjem 13,26 μ L vode, 2 μ L 10 X „HotStart Buffer complete“ pufera (Jena Bioscience, Njemačka), 1,6 μ L smjese deoksinukleozid-trifosfata („Geneamp® dNTP blend“, 2,5 mM svaki dNTP, Thermo Fisher Scientific, SAD), 1 μ L odgovarajućih početnica (Tablica 3), 0,14 μ L HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka) te 2 μ L uzorka DNA koncentracije 10 ng/ μ L. Lančana reakcija polimerazom provedena je na uređaju Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon inicijalne denaturacije (94°C, 2,5 min) slijedilo je 30 ciklusa umnažanja (94°C 20 s, 60°C 20 s, 72°C 1 min), a finalna elongacija provedena je na 72°C, 2 minute.

Tablica 3. Sekvence *forward* (F) i *reverse* (R) početnica za umnažanje gena *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* i *phoQ* i veličine amplikona. Sekvence početnica preuzete su iz rada Jelić 2018.

Gen	Sekvenca početnice	Veličina amplikona (pb)
<i>pmrA</i>	F: CGCAGGATAATCTGTTCTCCA	808
	R: GGTCCAGGTTTCAGTTGCAA	
<i>pmrB</i>	F: GCGAAAAGATTGGCAAATCG	1182
	R: ATCAATGGGTGCTGACGTT	
<i>mgrB</i>	F: ACCACCTCAAAGAGAAGGCGTT	347
	R: GGCGTGATTTTGACACGAACAC	
<i>phoP</i>	F: GAGCGTCAGACTACTATCGA	912
	R: GTTTTCCCATCTCGCCAGCA	
<i>phoQ</i>	F: CCACAGGACGTCATCACCA	1594
	R: GCAGGTGTCTGACAGGGATT	

Umnožena DNA detektirana je horizontalnom gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu („Agarose“, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljenom u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-baza, 1% v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) s 0,1% volumnim udjelom Sybr Safe boje („Sybr® Safe“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Prije nanošenja na gel, svakom je uzorku dodano 1,6 µL boje za nanošenje („DNA Gel Loading Dye 6X“, Thermo Fisher Scientific, SAD). DNA umnožena u prvoj reakciji analizirana je na gelu na koji je redom nanoseno 5 µL markera („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), po 9 µL uzoraka 1-12 iz reakcije za umnažanje gena *pmrA*, 5 µL markera, po 9 µL uzoraka 1-12 iz reakcije za umnažanje gena *mgrB* te 5 µL markera. DNA umnožena u drugoj reakciji analizirana je na gelu na koji je redom nanoseno 5 µL markera („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), po 9 µL uzoraka 1-12 iz reakcije za umnažanje gena *pmrB*, 5 µL markera, po 9 µL uzoraka 1-12 iz reakcije za umnažanje gena *phoP*, 5 µL markera, po 9 µL uzoraka 1-12 iz reakcije za umnažanje gena *phoQ* te 5 µL markera. Obje su elektroforeze provedene na 50V, 2,5 h. Gelovi su slikani uređajem za vizualizaciju DNA pod UV-svjetlošću OmniDOC (Cleaver Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo).

2.6.2 Pročišćavanje umnožene DNA i sekvenciranje gena *mgrB*

Kako su prema literaturi mutacije u genu *mgrB* najčešći uzrok rezistencije na kolistin u *K. pneumoniae*, a rezultati PCR-a i elektroforeze potvrđuju tu tvrdnju, sekvenciranje je provedeno samo za taj gen.

DNA produkti dobiveni lančanom reakcijom polimerazom pročišćeni su „Exo-Sap“ metodom. Pročišćavanje je provedeno u reakcijama volumena 3,75 µL, sadržavale su 1 U alkalne fosfataze škampa („FastAP™“, 1 U/µL, Thermo Fisher Scientific, SAD), 5 U egzonukleaze I („Exonuclease I“, 20 U/µL, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 2,5 µL PCR produkta. Reakcija pročišćavanja provedena je na uređaju Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD), a uvjeti reakcije bili su sljedeći: enzimska razgradnja 30 min na 37°C, inaktivacija enzima 15 min na 80°C te hlađenje na 4°C. Po završetku postupka, reakcija je razrijeđena dodavanjem 15 µL sterilne ultra-čiste vode („Nuclease-Free Water“, Qiagen, Njemačka).

Za reakciju sekvenciranja korištene su početnice specifične za gen *mgrB*, čije su sekvence preuzete iz literature (Jelić 2018): P1 ACCACCTCAAAGAGAAGGCGTT i P2 GGCGTGATTTTGACACGAACAC. Korišten je komplet reagencija „ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Ukupni volumen svake reakcije bio je 3 µL, a sastojao se od početnice koncentracije 1,6 pM, 0,6 µL „BigDye®

Terminator v1.1 Ready Reaction Mix“ (Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,3 μ L 5X pufera za sekvenciranje („BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer“, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 1 μ L pročišćenog PCR produkta. Sve su reakcije provedene na uređaju Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uvjeti reakcije bili su sljedeći: početna denaturacija 1 min na 96°C, 25 ciklusa sinteze DNA (denaturacija 10 s na 96°C, prijanjanje početnica 5 s na 50°C, elongacija 4 min na 60°C) te završetak reakcije hlađenjem na 4°C.

Reakcije su pročišćene metodom precipitacije etanolom, natrijevim acetatom i EDTA. Svakoj je reakciji dodano 0,3 μ L 125 mM EDTA (Sigma Life Science, Njemačka), 0,3 μ L 3M natrijevog acetata (Sigma Aldrich, Japan) i 8,7 μ L 96%-tnog etanola (Kemig d.o.o., Republika Hrvatska). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, 15 min, reakcije su centrifugirane na 2000 x g u trajanju od 35 min (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf®, Njemačka), pri sobnoj temperaturi. Supernatant je odliven, reakcije su isprane dodavanjem 15 μ L 70%-tnog etanola te centrifugirane na 1650 x g, 15 min (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf®, Njemačka). Supernatant je odliven, a produkti reakcije sekvenciranja su otopljeni u 20 μ L deioniziranog formamida („Hi-Di™ Formamide“, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Analiza sekvenci gena *mgrB* provedena je na uređaju ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputstvima proizvođača, iz 10 μ L pročišćenog produkta otopljenog u deioniziranom formamidu. Cjelovite sekvence DNA analiziranog gena sastavljene su iz fragmenata dobivenih sekvenciranjem pomoću računalnog programa „DNA Baser“ (Heracle BioSoft S.R.L., Rumunjska). Kako je sekvenciran kodirajući lanac DNA, napravljen je „reverse complement“ dobivene sekvence. Mutacije u genu *mgrB* identificirane su usporedbom sa slijedom nukleotida u genu divljeg tipa preuzetim iz GenBank baze podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Aminokiselinski sljedovi proteina MgrB dobiveni su koristeći online alat „EMBOSS Transeq“.

2.7 Molekularno-epidemiološka analiza lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za enterobakterijske ponavljajuće sekvence u konsenzusu (ERIC-PCR)

Za ERIC-PCR korišteni su uzorci DNA izolirani pomoću QIAamp DNA Mini Kit-a prema protokolu opisanom u Poglavlju 2.6.1, koji su razrijeđeni do konačne koncentracije 10 ng/ μ L.

Reakcijska smjesa za svaki od 12 ispitivanih uzoraka pripremljena je miješanjem 15,3 μ L vode, 2,5 μ L 10 X „HotStart Buffer complete“ pufera (Jena Bioscience, Njemačka), 2 μ L smjese deoksinukleozid-trifosfata („Geneamp® dNTP blend“, 2,5 mM svaki dNTP, Thermo Fisher Scientific, SAD), 2 μ L početnica (P1: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC, P2:

AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG, Versalovic i sur. 1991), 0,2 μL HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka) te 3 μL uzorka DNA koncentracije 10 ng/ μL . ERIC-PCR proveden je na uređaju Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon inicijalne denaturacije (94°C, 5 min) slijedilo je 35 ciklusa umnažanja (94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 5 min), a finalna elongacija provedena je na 72°C, 10 minuta.

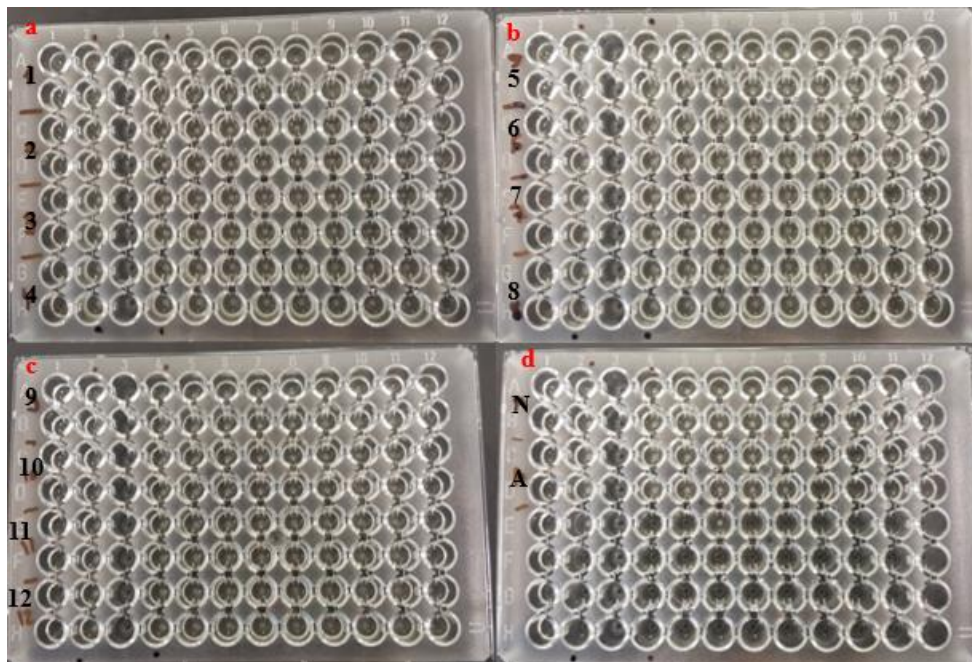
Umnožena DNA detektirana je horizontalnom gel elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu („Agarose“, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripremljenom u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-baza, 1% v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,0) s 0,1% volumnim udjelom Sybr Safe boje („Sybr® Safe“, Thermo Fisher Scientific, SAD).. Prije nanošenja na gel, svakom je uzorku dodano 4 μL boje za nanošenje („DNA Gel Loading Dye 6X“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Na gel je prvo nanijeto 5 μL markera („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD), zatim po 9 μL uzoraka 1-6, 5 μL markera, po 9 μL uzoraka 7-12, 5 μL markera, po 9 μL uzoraka 1-6, 5 μL markera, po 9 μL uzoraka 7-12 te 5 μL markera. Elektroforeza je provedena na 50 V, 2,5h. Gel je slikan uređajem za vizualizaciju DNA pod UV-svjetlošću OmniDOC (Clever Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3. REZULTATI

3.1 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu

Metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu testirana je osjetljivost na kolistin svih 12 kliničkih izolata *K. pneumoniae*, te kontrolnih sojeva *E. coli* NCTC 13846 i *E. coli* ATCC 25922. Vrijednosti MIC određene su kao koncentracija (mg/L) prvog stupca na pločici u kojem se ne vidi porast bakterijskog soja. Ukoliko je porast bakterijskog soja vidljiv i u stupcu 12, minimalna inhibitorna koncentracija određena je kao barem 64 mg/L i zapisana kao ≥ 64 . Vrijednosti MIC svakog pojedinog soja i replike zapisane su u Tablici 4.

Na Slikama 1a-1d vidljivo je da u stupcima 1 nema bakterijskog rasta, dok ga u stupcima 2 ima, tj. da je negativna kontrola bistra, a pozitivna zamućena. Prema EUCAST smjernicama izolat *K. pneumoniae* je rezistentan na kolistin ukoliko je vrijednost MIC veća od 2 mg/L. Na Slici 1a-1c vidljiv je porast svih 12 ispitivanih sojeva. Vrijednosti MIC prve i druge replike su iste za većinu sojeva. Kod sojeva 3 i 9 vrijednosti MIC prve i druge replike se razlikuju, ali obje replike i dalje pokazuju rezistenciju na kolistin. Iz očitanih vrijednosti vidljivo je da su svi ispitivani sojevi rezistentni na kolistin. Vrijednosti MIC kontrolnih sojeva NCTC i ATCC iznose 4 mg/L za obje replike, iz čega se zaključuje kako su oba soja rezistentna na kolistin. Soj *E. coli* NCTC 13846 uistinu je rezistentan na kolistin, a očekivana vrijednost MIC je 4 mg/L. Kako soj *E. coli* ATCC 25922 treba biti osjetljiv na kolistin, dobiveni rezultat nije u skladu s očekivanim.



Slika 1. Mikrotitarske pločice s ispitivanim bakterijskim sojevima nakon inkubacije na 37°C tijekom 24h. Brojevi 1-12 predstavljaju bakterijske izolate istih oznaka (1a-1c), N označava soj *E. coli* NCTC 13846 (1d), a A soj *E. coli* ATCC 25922 (1d).

Tablica 4. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/L) kolistina za 12 ispitivanih sojeva *K. pneumoniae* te kontrolne sojeve NCTC i ATCC očitane prema Slikama 1a-1d. MIC₁ označava MIC prvog mjerenja, a MIC₂ MIC drugog mjerenja.

Uzorak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	NCTC	ATCC
MIC ₁ (mg/L)	32	≥64	≥64	32	32	32	16	32	≥64	32	32	32	4	4
MIC ₂ (mg/L)	32	≥64	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	4	4

3.2 Ispitivanje prisutnosti plazmidnih gena *mcr*

U uzorcima 1-12 ispitana je prisutnost plazmidnih gena *mcr* metodom lančane reakcije polimerazom s početnicama za gene *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* i *mcr-4*, a umnoženi DNA produkti analizirani su gel elektroforezom. Na gelovima su bile vidljive vrpce markera veličine, ali nije bilo vidljivih vrpca uzoraka, što znači da nije došlo do umnažanja DNA ni u jednoj od 4 provedene lančane reakcije polimerazom te da geni *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* ni *mcr-4* nisu prisutni u analiziranim uzorcima. Ni u jednom od 12 ispitivanih sojeva, tj. kliničkih izolata nije ustanovljena rezistencija na kolistin posredovana kromosomskim genima *mcr-1*, *mcr-2* ili *mcr-3* i *mcr-4*.

3.3 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena

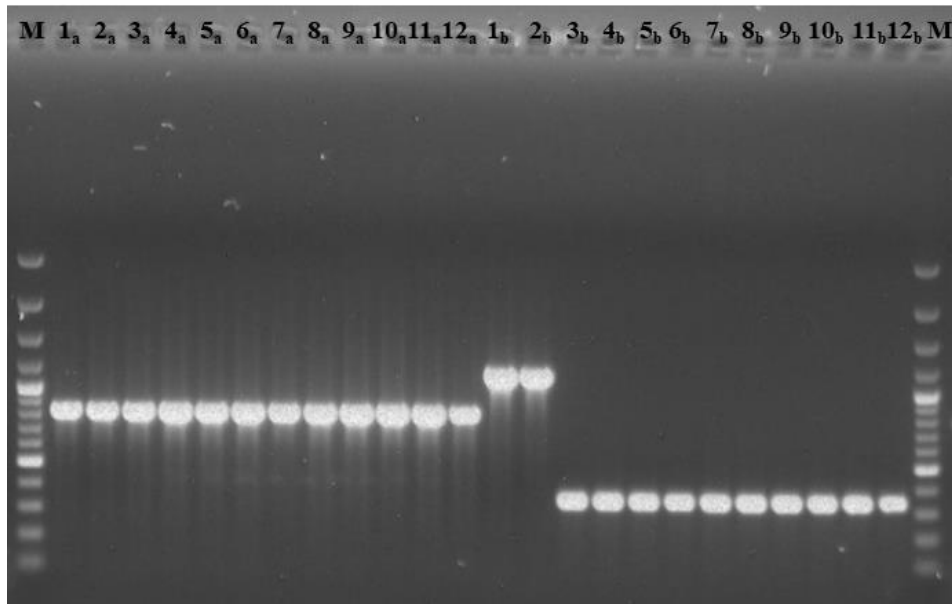
3.3.1 Izolacija DNA i lančana reakcija polimerazom

U uzorcima 1-12 ispitana je prisutnost mutacija kromosomskih gena *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* i *phoQ* metodom lančane reakcije polimerazom i analizom PCR produkata gel elektroforezom. Izoliranoj DNA svih 12 uzoraka pomoću spektrofotometra su određene čistoća i koncentracija. Koncentracija DNA normalizirana je kako bi njena konačna koncentracija u 50 μL -skim reakcijama iznosila 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Tablica 5).

Tablica 5. Čistoća i koncentracije DNA izolirane iz 12 kliničkih izolata *K. pneumoniae*, volumen izolirane DNA potreban za 50 μL -ske reakcije konačne koncentracije DNA 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ te odgovarajući volumeni vode.

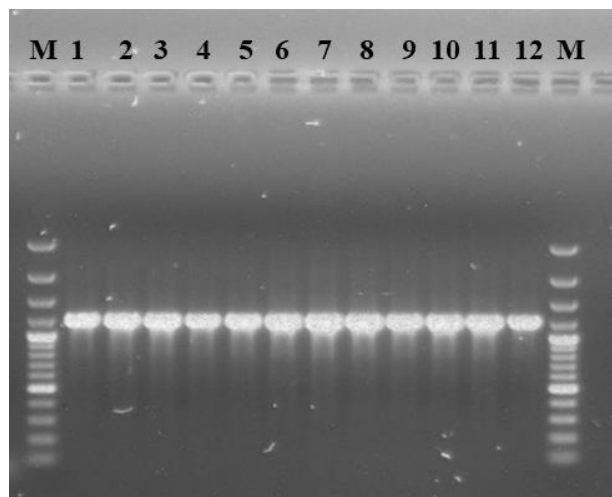
Uzorak	A _{260/280}	A _{260/230}	c ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	V _{uzorak} (μL)	V _{voda} (μL)
1	1,10	0,94	22,9	21,8	28,2
2	0,98	1,30	19,3	25,9	24,1
3	1,02	1,33	21,7	23,0	27,0
4	1,16	1,28	26,0	19,2	30,8
5	1,08	1,24	23,3	21,5	28,5
6	1,07	1,31	23,9	20,9	29,1
7	1,21	1,38	15,6	32,1	17,9
8	1,11	1,42	25,4	19,7	30,3
9	1,17	1,53	26,1	19,2	30,8
10	1,18	1,50	27,2	18,4	31,6
11	1,16	1,38	28,3	17,7	32,3
12	1,22	1,66	31,7	1,6	48,4

Na gelu prikazanom na Slici 2 vide se produkti umnažanja DNA s početnicama za gene *pmrA* i *mgrB*. U jažicama označenim s 1_a-12_a vidljiva je po jedna vrpca veličine otprilike 800 pb, što odgovara očekivanoj veličini amplikona dobivenog u lančanoj reakciji polimerazom s početnicama za umnažanje gena *pmrA*. U jažicama označenim s 1_b i 2_b vidljiva je po jedna vrpca veličine otprilike 1200 pb, dok se u jažicama označenim s 3_b-12_b vidi po jedna vrpca veličine između 300 i 400 pb. Kako je očekivana veličina amplikona dobivenog u lančanoj reakciji polimerazom s početnicama za umnažanje gena *mgrB* 347 pb, ovakvi rezultati pokazuju kako je kod sojeva 1 i 2 došlo do insercija u genu *mgrB*.



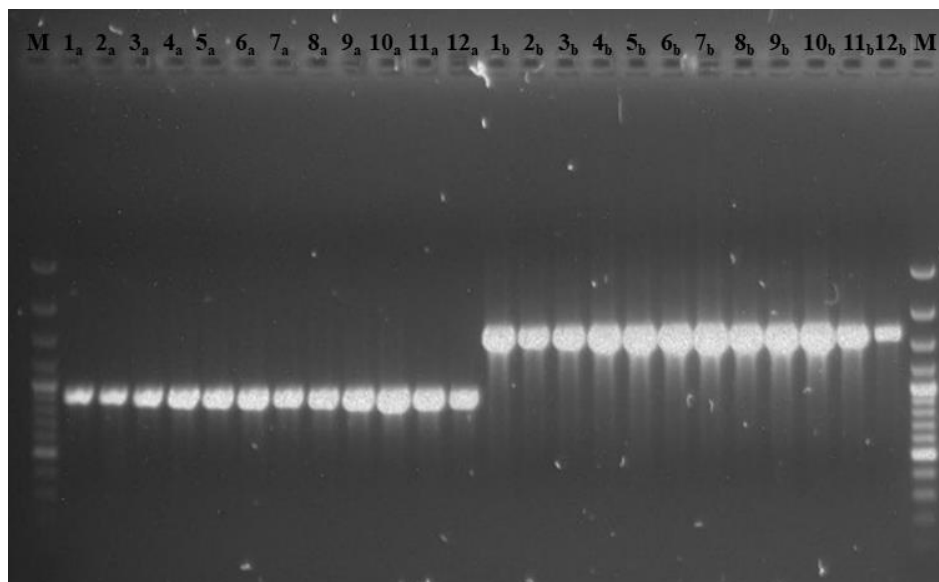
Slika 2. Analize DNA umnožene lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za kromosomske gene *pmrA* te *mgrB* u uzorcima 1-12 na 1%-tnom agaroznom gelu. M – marker veličine, 1_a-12_a – uzorci 1-12 umnoženi s početnicama za gen *pmrA*, 1_b-12_b – uzorci 1-12 umnoženi s početnicama za gen *mgrB*.

Na gelu prikazanom na Slici 3 vide se produkti umnažanja DNA s početnicama za gen *pmrB*. U jažicama označenim s 1-12 vidljiva je po jedna vrpca veličine otprilike 1200 pb, što odgovara očekivanoj veličini amplikona dobivenog u lančanoj reakciji polimerazom s početnicama za umnažanje gena *pmrB*, koja iznosi 1182 pb.



Slika 3. Analiza DNA umnožene lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za kromosomski gen *pmrB* u uzorcima 1-12 na 1%-tnom agaroznom gelu. M – marker veličine, 1-12 – uzorci 1-12.

Na gelu prikazanom na Slici 4 vide se produkti umnažanja DNA s početnicama za gene *phoP* i *phoQ*. U jažicama označenim s 1_a-12_a vidljiva je po jedna vrpca veličine između 900 i 1000 pb. Očekivana veličina amplikona iznosi 912 pb, što se slaže s dobivenim rezultatima. U jažicama označenim s 1_b-12_b vidi po jedna vrpca veličine između 1500 i 2000 pb. Očekivana veličina amplikona za gen *phoQ* je 1594 pb, što odgovara dobivenim rezultatima.



Slika 4. Analize DNA umnožene lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za kromosomske gene *phoP* te *phoQ* u uzorcima 1-12 na 1%-tnom agaroznom gelu. M – marker veličine, 1_a-12_a – uzorci 1-12 umnoženi s početnicama za gen *phoP*, 1_b-12_b – uzorci 1-12 umnoženi s početnicama za gen *phoQ*.

3.3.2 Sekvenciranje gena *mgrB*

Prisutnost mutacija gena *mgrB* u uzorcima 1-12 ispitana je sekvenciranjem. Sekvenciranje gena *mgrB* potvrdilo je kako je upravo on odgovoran za rezistenciju na kolistin u svih 12 ispitivanih kliničkih izolata *K. pneumoniae*. U izolata 1 i 2 radi se o insercijskoj mutaciji, tj. ugradnji insercijskog elementa IS1 veličine otprilike 850 pb. Insercijski element IS1 nalazi se ispred samog gena, čija je sekvenca nepromijenjena i odgovara onoj divljeg tipa.

Izolati 3-12 pripadaju istom klonu. Sekvenciranjem je ustanovljeno kako je rezistencija na kolistin uzrokovana istom točkastom mutacijom (A→T) nukleotida broj 7, koja rezultira preuranjenim STOP kodonom i proizvodnjom skraćenog, nefunkcionalnog proteina.

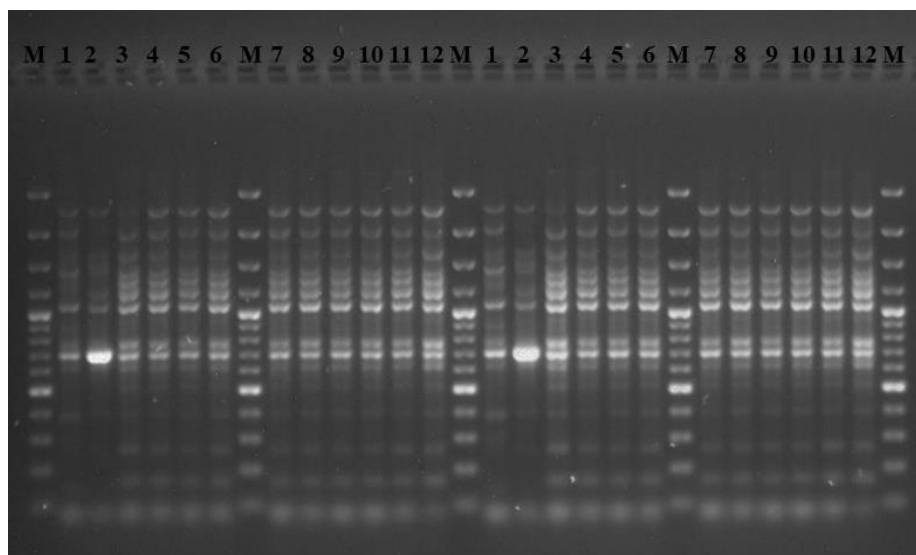
- A) GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTG
TTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTT
TTCAGCGGCATTTGCACTATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA
- B) GGCCTGATTTTGACACGAACACGTTTTGAAACAAGTCGATGATTCCTAAAC
TTACCTTTTCGTAATACAGTTAGCCGCGGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTG
GCGACATTGCGTACTGATGCGGAGAGTGGA[IS1]GTGAAAAAATTACGGTG
GGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGGACTCAGAT
GCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCAC
TATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAAGACATTTTTCTGCCGACTGATTTCCCT
CTGCGCCGCGGGTGGTAGAATGAACGCCTTCTCTTTGAGGTGGT
- C) GTGAAA[T]AATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCT
GTTGCTGTGGACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTT
TTTCAGCGGCATTTGCACTATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA
- D) VKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*
- E) VKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*
- F) VK*LRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*

Slika 5. Sekvenca DNA divljeg tipa gena *mgrB* (A) i gena *mgrB* izolata 1 i 2 (B) te izolata 3-12 (C), aminokiselinska sekvenca divljeg tipa proteina MgrB (D) te proteina MgrB izolata 1 i 2 (E) i izolata 3-12 (F). Mjesto insercije transpozicijskog elementa IS1 označeno je kao [IS1], a točkasta mutacija A→T kao [T]. Sekvenca gena *mgrB* izolata 1 i 2 je podcrtana. STOP kodoni označeni su simbolom *.

3.4 Molekularno-epidemiološka analiza lančanom reakcijom polimerazom s početnicama za enterobakterijske ponavljajuće sekvence u konsenzusu (ERIC-PCR)

Na gelu (Slika 6) jasno su vidljive vrpce u svim jažicama. Izolati 1 i 2 imaju isti uzorak, tj. broj i raspored vrpce, što znači da se radi o istom bakterijskom soju. Izolati 3-12 imaju isti uzorak, koji se razlikuje od onog prva 2 izolata, te se može zaključiti kako spomenuti izolati pripadaju istom soju. Isti je rezultat vidljiv u prvoj i drugoj replici, što upućuje na vjerodostojnost rezultata.

Analiza upućuje da se od ukupno 12 izolata *K. pneumoniae*, radi o svega 2 različita bakterijska soja.



Slika 6. Analize DNA umnožene metodom ERIC-PCR na 2%-tnom agaroznom gelu. M – marker veličine, 1-12 – uzorci 1-12.

4. RASPRAVA

4.1 Testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu

Prema EUCAST smjernicama (2019) soj *K. pneumoniae* definira se kao rezistentan na kolistin ukoliko je vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije kolistina veća od 2 mg/L. Vrijednosti MIC-ova svih 12 ispitivanih kliničkih izolata *K. pneumoniae* određene metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu veće su od 2 mg/L, što potvrđuje inicijalne rezultate Zavoda za kliničku mikrobiologiju, tj. da su sojevi uistinu rezistentni na kolistin.

Vrijednosti MIC dobivene za kontrolni soj *E. coli* NCTC 13846 odgovaraju podacima iz literature. Taj je soj *mcr-1* pozitivan i rezistentan na kolistin, a očekivana vrijednost MIC iznosi 4 mg/L (CLSI, 2015), što odgovara dobivenim rezultatima.

Kontrolni soj *E. coli* ATCC 25922, koji služi za kontrolu kvalitete, prema literaturi je osjetljiv na kolistin i vrijednosti MIC trebale bi iznositi između 0,25 i 2 mg/L (CLSI 2015). Dobiveni se rezultati (MIC 4 mg/L) ne slažu s očekivanjima. Kako su vrijednosti MIC 12 ispitivanih sojeva i kontrolnog soja NCTC u skladu s očekivanjima, da se zaključiti da su rezultati eksperimenta valjani. Turlej-Rogacka i sur. (2018) pokazali su da testiranje osjetljivosti na kolistin metodom mikrodilucije daje varijabilnije rezultate. U spomenutom je radu korišten isti ATCC soj, a jedna je od vrijednosti MIC iznosila 4 mg/L. Poirel i sur. (2017) također naglašavaju kako je metoda mikrodilucije često nepouzdana i daje varijabilne rezultate. Iako ju EUCAST (2019) i CLSI (2015) preporučaju za testiranje osjetljivosti na kolistin, i dalje ne postoji potpuno pouzdana metoda testiranja. Nadalje, varijabilnost rezultata može biti i posljedica upotrebe kolistina različitih proizvođača.

4.2 Ispitivanje prisutnosti rezistencije na kolistin posredovane plazmidnim genima *mcr*

Analiza umnožene DNA izolirane iz svih 12 ispitivanih uzoraka koristeći početnice za 4 plazmidna gena *mcr* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* i *mcr-4*) pokazala je da rezistencija ni u jednom od 12 ispitivanih uzoraka nije posredovana plazmidnim genima. Ovakvi su se rezultati mogli i očekivati, budući da rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima *mcr* nije toliko učestala u usporedbi s onom posredovanom kromosomskim genima. Gen *mcr-1*, koji se od svih gena *mcr* najčešće povezuje s rezistencijom na kolistin, u ljudskih je izolata prvi put pronađen 2008. godine u *Shigella sonnei* u Vijetnamu. Od tada je opisan u različitim dijelovima svijeta, uključujući Afriku, Aziju, Europu i Ameriku, te u različitim vrstama iz porodice Enterobacterales, no najčešće u *E. coli*. U bakterija roda *Klebsiella* njegova je pojava zabilježena samo sporadično (Dalmolin i sur. 2018). Iako je ovo istraživanje provedeno na malom broju uzoraka, te ne

predstavlja reprezentativnu sliku stanja u Republici Hrvatskoj, rezultati su u skladu s dosadašnjim spoznajama iz Europe i svijeta.

4.3 Ispitivanje prisutnosti mutacija kromosomskih gena

Analizom metodom PCR i sekvenciranjem ustanovljeno je da je svih 12 ispitivanih izolata *K. pneumoniae* rezistentno na kolistin zbog mutacije u genu *mgrB*, čije su mutacije inače odgovorne za pojavu rezistencije na kolistin u *K. pneumoniae* (Cannatelli i sur. 2014). Izolati 3-12 imaju točkastu mutaciju koja dovodi do preuranjenog STOP kodona i proizvodnje skraćenog, nefunkcionalnog proteina MgrB. U izolata 1 i 2 sekvenca gena *mgrB* identična je onoj gena divljeg tipa, no došlo je do transpozicije elementa IS1 u regiji uzvodno od samog gena. Kako struktura operona *mgrB* i mehanizmi regulacije njegove ekspresije u *K. pneumoniae* još nisu dovoljno istraženi, može se samo pretpostaviti pozicija promotora (Slika 7, Poirel i sur. 2014). Insercija sekvence IS1 unutar navodnog promotora PROM vjerojatno je negativno utjecala na razinu ekspresije i dovela do proizvodnje nedovoljne količine proteina MgrB. Nedostatak proteina MgrB dovodi do prekomjerne ekspresije operona *phoPQ*, aktivacije operona *pmrHFIJKLM* i proizvodnje L-Ara4N te posljedične rezistencije na kolistin (Poirel i sur. 2017). Analizom aminokiselinskih sekvenci proteina MgrB svih 12 izolata vidljivo je da je u svih prva aminokiselina valin, a ne metionin. Takav je slijed posljedica korištenja alternativnog START kodona GUG, umjesto AUG (Asano 2014).

```
TTATTTGTATGATCCCTGGCGTGATTTTGACACGAACACGTTTGAACAAGTCGATGATTCCTAAACTTACCTTTCGTAATACAG
                    -35          PROM          -10
                    ↓
TTAGCCGCGGTTTAAGAAGGCCGTGCTATCCTGGCGACATTGCGTACTGATGCGGAGAGTGGAGTG
                                                -> start codon mgrB
```

Slika 7. Sekvenca gena *mgrB* i uzvodne regije, pozicija navodnog promotora PROM te označene navodne regije -35 i -10 (Poirel i sur. 2014).

Analiza PCR produkata dobivenih umnažanjem kromosomskih gena *pmrA*, *pmrB*, *phoP* i *phoQ* nije pokazala prisutnost mutacija, no to se ne znači da one nisu prisutne. Idući korak bio bi sekvenciranje spomenutih gena, kako bi se vidjelo jesu li prisutne točkaste mutacije, manje insercije ili delecije, ili druge mutacije.

4.4 Molekularno-epidemiološka analiza

Analizom ERIC-PCR utvrđeno je da svih 12 ispitivanih izolata *K. pneumoniae* pripada dvama bakterijskim sojevima. Izolati 1 i 2 pripadaju jednom soju, dok izolati 3-12 pripadaju drugom. Isti su rezultati dobiveni i sekvenciranjem gena *mgrB*, pri čemu je ustanovljeno da

izolati 1 i 2 imaju istu inserciju u genu, dok izolati 3-12 imaju istu točkastu mutaciju. Izolati čija je rezistencija posljedica mutacija kromosomskih gena epidemiološki su povezani, što se na gelu vidi kao isti uzorak vrpce. Da je rezistencija posredovana plazmidnim genima, dobila bi se znatno šarolikija epidemiološka slika, tj. veći broj različitih bakterijskih sojeva. Kako ni u jednom izolatu nije utvrđena rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima, ovakvi su rezultati bili očekivani. Ukoliko se gen za rezistenciju nalazi na plazmidu, rezistencija se može horizontalnim prijenosom širiti na druge bakterije, te je u tom slučaju za očekivati da će se bakterijski sojevi međusobno razlikovati. Prijenos kromosomskih gena ne događa se toliko učestalo. Kako se radi o širenju jednog klona, dobiva se uniformna epidemiološka slika, odnosno radi se o znatno manjem broju bakterijskih sojeva.

Svih dvanaest pacijenata od kojih su prikupljeni izolati *K. pneumoniae* bakterijom se zarazilo tijekom boravka u bolnici, iz čega se može zaključiti da se radi o epidemiji unutar bolničkog okruženja. Molekularni profili rezistentnih bakterija često su toliko specifični da se razlikuju se od bolnice do bolnice, a pojedini bakterijski soj može se povezati s bolnicom iz koje potječe (Schürch i Siezen 2010). Kako svi prikupljeni izolati *K. pneumoniae* potječu iz dvije bolnice, za očekivati je da će pripadati dvama sojevima.

5. ZAKLJUČAK

Provedenim je istraživanjem potvrđen inicijalni rezultat Zavoda za kliničku mikrobiologiju gdje je utvrđeno kako su klinički izolati *K. pneumoniae* prikupljeni u periodu od 1. srpnja do 1. rujna 2018. godine u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ rezistentni na kolistin.

Metodama lančane reakcije polimerazom i gel elektroforezom utvrđeno je kako ni jedan od 12 ispitivanih izolata nema plazmidom posredovanu rezistenciju na kolistin, tj. nije utvrđena prisutnost plazmidnih gena *mcr-1*, *mcr2*, *mcr-3* ni *mcr-4* odgovornih za rezistenciju. Istim je metodama pokazano kako je rezistencija na kolistin u ispitivanih izolata posljedica mutacija kromosomskih gena, točnije gena *mgrB*. U svrhu detaljnijeg razumijevanja molekularnih mehanizama rezistencije gen *mgrB* je sekvenciran, čime se pokazalo kako je u izolatima *K. pneumoniae* 1 i 2 došlo do insercije transpozicijskog elementa IS1 ispred samog gena, a kod izolata 3-12 do točkaste mutacije nukleotida broj 7 u samom genu. Iako struktura operona *mgrB* još nije detaljno istražena u *K. pneumoniae*, smatra se da pozicija na koju se ugradio element IS1 odgovara promotoru gena, te da je insercijska mutacija rezultirala smanjenom ekspresijom gena i proizvodnjom nedovoljne količine inače funkcionalnog proteina MgrB. Točkasta mutacija rezultirala je preuranjenim STOP kodonom i proizvodnjom krnjeg, nefunkcionalnog proteina MgrB. Nedovoljna količina funkcionalnog proteina MgrB u oba slučaja dovela je do rezistencije na kolistin.

Molekularno epidemiološkom analizom, točnije metodom ERIC-PCR, utvrđeno je kako svih 12 izolata pripada dvama bakterijskim sojevima. Izolati 1 i 2 pripadaju jednom, a izolati 3-12 drugom soju. Ovakvi se rezultati slažu s onima dobivenim sekvenciranjem gena *mgrB*. Kako su izolati prikupljeni u ukupno dvije bolnice u Zagrebu, a kod svih se pacijenata radilo o bolničkoj infekciji *K. pneumoniae*, očekivano se radi o svega dva različita bakterijska soja.

6. LITERATURA

- Asano K. (2014): Why is start codon selection so precise in eukaryotes?. Translation 2: e28387.
- Ashurst J. V. i Dawson A. Pneumonia, *Klebsiella*. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
- Biswas S., Brunel J.-M., Dubus J.-C., Reynaud-Gaubert M. i Rolain J.-M. (2012): Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. Expert Review of Anti-Infective Therapy 10: 917-934.
- Bockstael K. i Van Aerschot A. (2009): Antimicrobial resistance in bacteria. Central European Journal of Medicine 4: 141-155.
- Caniaux I., van Belkum A., Zambardi G., Poirel L. i Gros M. F. (2016): MCR: modern colistin resistance. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 36: 415-420.
- Cannatelli A., Giani T., D'Andrea M. M., Di Pilato V., Arena F., Conte V., Tryfinopoulou K., Vatopoulos A. i Rossolini G. M. (2014): MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58: 5696-5703.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23rd informational supplement. CLSI Document M100-S25.
- Dalmolin T. V., de Lima-Morales D. i Barth A. L. (2018): Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know?. Journal of Infectiology 1: 16-22.
- Granata G. i Petrosillo N. (2017): Resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*: A 4.0 strain?. Infectious Disease Reports 9: 7104.
- Haeili M., Javani A., Moradi J., Jafari Z., Feizabadi M. M. i Babeai E. (2017): MgrB alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. Frontiers in Microbiology 8: 72-73.
- Iredell J., Brown J. i Tagg K. (2016): Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. British Medical Journal 352:h6420.
- Jayol A., Nordmann P., Desroches M., Decousser J.-W. i Poirel L. (2016): Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60:3199-3201.
- Jelić M. (2018): Mehanizmi rezistencije na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 191 p.
- Loho T. Dharmayanti A. (2015): Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. Acta medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine 47: 157-68.
- Martinez J. L. (2014): General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug Discovery Today: Technologies 11: 33-39.

- Munita J. M. i Arias C. A. (2016): Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/.
- Paczosa M. K. i Mecsas J. (2016): *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 629-661.
- Poirel L., Jayol A. i Nordmann P. (2017): Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30: 557-596.
- Poirel L., Jayol A., Bontron S., Villegas M.-V., Ozdamar M., Turkoglu S. i Nordmann P. (2014): The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70: 75-80.
- Schürch A. C. i Siezen R. J. (2010): Genomic tracing of epidemics and disease outbreaks. *Microbial Biotechnology* 3: 628-633.
- Thanh D. P., Tuyen H. T., Nguyen T. N. T., The H. C., Wick R. R., Thwaites G., Baker S. i Holt K. E. (2016): Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71: 2314–2317.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.
- Turlej-Rogacka A., Xavier B. B., Janssens L., Lammens C., Zarkotou O., Pournaras S., Goossens H. i Malhotra-Kumar S. (2018): Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37: 345-353.
- Ventola C. L. (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics Journal* 40: 277-283.
- Versalovic J., Koeuth T. i Lupski R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.
- Walter J., Haller S., Quinten C., Kärki T., Zacher B., Eckmanns T., Abu S. M., Plachouras D., Kinross P. i Suetens C. (2018): Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. *Euro Surveillance*. 2018 23:pii=1700843.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. kolovoza 1994. u Zagrebu. Pohađala sam osnovnu školu „Petar Zrinski“ i V. gimnaziju, također u Zagrebu. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013., a diplomski studij Molekularne biologije 2016. godine.

Od kolovoza 2016. do kolovoza 2018. godine bila sam glavni organizator Europskog simpozija studenata biologije – SymbioSE 2018 Croatia, koji se održao u srpnju 2018. godine na PMF-u u Zagrebu.

Od veljače do lipnja 2018. godine bila sam na Erasmus+ studentskoj razmjeni na Heinrich-Heine Sveučilištu u Düsseldorfu, u laboratoriju profesora Williama F. Martina.

Od listopada 2016. do veljače 2018. godine obavljala sam laboratorijsku stručnu praksu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića.

Na prvoj godini diplomskog studija bila sam demonstrator na kolegiju Animalna fiziologija, pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Benković.

Za vrijeme studija aktivno sam sudjelovala na manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ 2014., 2015., 2016. i 2017. godine, te na Danu za znanost u Koprivnici 2017. godine, gdje sam bila voditelj radionice i edukator.

U slobodno se vrijeme bavim volonterskim radom te sam tako, između ostalog, sudjelovala na Festivalu kazališta znak i zvuk i na 16. Zagreb Film Festivalu.