

Rasprostranjivanje gena za rezistenciju na cefalosporine treće generacije među bakterijama komunalnih otpadnih voda

Kodela Pacenti, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:701563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivan Kodela Pacenti

**Rasprostranjivanje gena za rezistenciju na
cefalosporine treće generacije među
bakterijama komunalnih otpadnih voda**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ivan Kodela Pacenti

**Dissemination of genes encoding resistance to
third generation cephalosporins among
bacteria from municipal wastewater**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za okolišnu mikrobiologiju i biotehnologiju na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr.sc. Nikoline Udiković Kolić te komentorstvom prof.dr.sc. Jasne Hrenović. Diplomski rad *Rasprostranjivanje gena za rezistenciju na cefalosporine treće generacije među bakterijama komunalnih otpadnih voda* napravljen je u sklopu projekta Hrvatske Zaklade za znanost pod nazivom „Antibiotska rezistencija u uređajima za obradu otpadnih voda u Hrvatskoj: naglasak na β -laktamaze proširenog spektra i karbapenemaze (WasteCare)“, IP-2019-04-5539, voditeljice projekta dr.sc. Nikoline Udiković Kolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistra ekologije i zaštite prirode.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Rasprostranjivanje gena za rezistenciju na cefalosporine treće generacije među bakterijama komunalnih otpadnih voda

Ivan Kodela Pacenti

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterijska otpornost na antibiotike predstavlja značajnu prijetnju za ljudsko zdravlje zbog ograničenih mogućnosti u liječenju infektivnih bolesti. Cefalosporini treće generacije su antibiotici koji se koriste u liječenju mnogih infekcija, ali Gram-negativne bakterije ih mogu uspješno hidrolizirati pomoću β -laktamaza proširenog spektra (ESBL), čiji geni se uglavnom nalaze na plazmidima. Važnu ulogu u širenju te otpornosti imaju uređaji za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) unutar kojih bakterije, pod pritiskom antibiotika i drugih zagađivala, izmjenjuju gene za otpornost putem plazmida. U ovom istraživanju korištena je metoda egzogene izolacije plazmida za analizu prijenosa ESBL gena iz bakterija pročišćenih otpadnih voda iz sedam UPOV-a u bakteriju primatelj *Escherichia coli* CV601. Dobiveno je 18 pozitivnih transkonjuganata (*E. coli* CV601 s ESBL genom na plazmidu) iz pet analiziranih UPOV-a. Većina transkonjuganata je ispoljavala višestruko otporan fenotip potvrđen metodama disk difuzije i mikrodilucije. Primjenom metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i agarozne gel elektroforeze, na svim plazmidima pozitivnih transkonjuganata potvrđena je prisutnost ESBL gena *bla_{CTX-M-1}* i *bla_{TEM}*, dok je na jednom plazmidu dodatno detektiran gen *bla_{GES}*. Osam plazmida je dodatno nosilo gen za karbapenemazu *bla_{VIM}* ili *bla_{NDM}*. Primjenom PCR metode za određivanje replikona, u svim pozitivnim transkonjugantima potvrđena je prisutnost jednog do tri plazmida koji su po tipu replikona većinom pripadali skupini inkompatibilnosti IncL/M.

Ključne riječi: plazmidi, horizontalni prijenos gena, β -laktamaze proširenog spektra, otpadna voda, karbapenemaze, cefalosporini treće generacije

(44 stranice, 12 slika, 9 tablica, 108 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr.sc. Nikolina Udiković Kolić

Komentor: prof.dr.sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji:

Prof.dr.sc. Jasna Hrenović

Izv.prof.dr.sc. Tomislav Ivanković

Prof.dr.sc. Goran Klobučar

Rad prihvaćen: 9. veljače 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Dissemination of genes encoding resistance to third generation cephalosporins among bacteria from municipal wastewater

Ivan Kodela Pacenti

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacterial resistance to antibiotics poses a significant threat to human health due to limited treatment options in the treatment of infectious diseases. Third-generation cephalosporins are antibiotics used to treat many infections, but Gram-negative bacteria can successfully hydrolyze them using extended-spectrum β -lactamases (ESBL), whose genes are usually found on plasmids. Wastewater treatment plants (WWTPs) play an important role in the spread of this resistance because bacteria there exchange resistance genes via plasmids under the pressure of antibiotics and other contaminants. In this study, the exogenous plasmid isolation method was used to analyze the transfer of ESBL genes from bacteria in treated wastewater from seven WWTPs to the recipient bacterium, *Escherichia coli* CV601. Eighteen positive transconjugants (*E. coli* CV601 with ESBL gene on plasmid) were obtained from five WWTPs studied. Most of the transconjugants exhibited a multidrug-resistant phenotype, which was confirmed by disk diffusion and microdilution methods. PCR and agarose gel electrophoresis confirmed the presence of the ESBL genes *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{TEM} on all plasmids of the positive transconjugants, with the additional detection of the *bla*_{GES} gene on one plasmid. Eight plasmids also carried the carbapenemase genes *bla*_{VIM} or *bla*_{NDM}. Using the polymerase chain reaction-based replicon typing (PBRT) method, the presence of one to three plasmids belonging mainly to the IncL/M incompatibility group was confirmed for all positive transconjugants.

Keywords: plasmids, horizontal gene transfer, extended-spectrum β -lactamases, wastewater, carbapenemases, 3rd generation cephalosporins

(44 pages, 12 figures, 9 tables, 108 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Nikolina Udiković Kolić, PhD

Co-mentor: Prof. Jasna Hrenović, PhD

Reviewers:

Prof. Jasna Hrenović, PhD

Assoc. prof. Tomislav Ivanković, PhD

Prof. Goran Klobučar, PhD

Thesis accepted: 9th February 2023

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr.sc. Nikolini Udiković Kolić na strpljenju, stručnim savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada.

Hvala komentorici prof.dr.sc. Jasni Hrenović na pomoći u izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici dr.sc. Svjetlani Dekić Rožman te mag.ing.agr. Ani Puljko na savjetima ukazanim u laboratorijskom dijelu izrade diplomskog rada.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji i bliskim ljudima koji su me konstantno podržavali tijekom izrade diplomskog rada i cjelokupnog studiranja.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. β -laktamski antibiotici.....	1
1.1.1. Cefalosporini treće generacije (3GC).....	2
1.1.2. Karbapenemi	3
1.2. Mehanizmi otpornosti bakterija na β -laktamske antibiotike	3
1.2.1. Mehanizmi otpornosti na β -laktamske antibiotike	4
1.2.2. Otpornost na 3GC posredovana ESBL enzimima	4
1.2.3. Otpornost na karbapeneme posredovana karbapenemazama	5
1.3. Uloga plazmida u širenju otpornosti na 3GC	6
1.4. Uloga uređaja za pročišćavanje otpadnih voda kao put širenja otpornosti.....	7
2. Ciljevi istraživanja.....	8
3. Materijali i metode	8
3.1. Popis materijala	8
3.1.1. Uzorci otpadne vode i bakterije primatelji	8
3.1.2. Antibiotici.....	9
3.1.3. Hranjive podloge	10
3.1.3.1. Priprema krute Luria-Bertani (LB) hranjive podloge sa i bez dodatka antibiotika ...	10
3.1.3.2. Priprema 10%-tnog triptoza sojinog bujona (eng. <i>tryptic soy broth</i> , TSB).....	11
3.1.3.3. Priprema Mueller-Hintonovog agara (MHA).....	11
3.1.3.4. Priprema Mueller-Hintonovog bujona.....	11
3.1.3.5. Priprema Mueller-Hintonovog bujona II.....	11
3.1.4. Priprema agaroznog gela	11
3.1.5. Priprema fiziološke otopine.....	11
3.2. Egzogena izolacija plazmida koji nose gene za otpornost na cefotaksim	12
3.2.1. Priprema uzoraka i kontrola	12
3.2.2. Prijenos plazmidne DNA iz bakterija davatelj u bakteriju primatelj konjugacijom.....	13
3.2.3. Pročišćavanje i pohrana potencijalnih transkonjuganata.....	14
3.3. Izolacija ukupne bakterijske DNA iz potencijalnih <i>E. coli</i> transkonjuganata	15
3.4. Detekcija pozitivnih transkonjuganata pomoću metoda lančane reakcije polimerazom s početnicom BOX i agarozne gel elektroforeze	15
3.5. Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom disk difuzije.....	17
3.6. Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na karbapeneme i kolistin (COL) metodom mikrodilucije	18
3.7. Izolacija plazmidne DNA.....	19
3.8. Detekcija gena koji kodiraju za ESBL i karbapenemaze pomoću metoda PCR-a i agarozne gel elektroforeze	19
3.9. Određivanje skupine inkompatibilnosti plazmida metodom lančane reakcije polimerazom za identifikaciju replikona (PBRT).....	22

4.	Rezultati.....	24
4.1.	Detekcija <i>E. coli</i> transkonjuganata s plazmidom koji nosi ESBL gen	24
4.2.	Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike	26
4.3.	Detekcija ESBL gena i gena za karbapenemaze na plazmidima.....	28
4.4.	Klasifikacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti.....	30
5.	Rasprava	30
6.	Zaključci.....	33
7.	Literatura	35
8.	Životopis.....	44

Kratice korištene u radu:

3GC – treća generacija cefalosporina

CFU – jedinica za stvaranje kolonije (eng. *colony forming unit*)

CTX – cefotaksim (eng. *cefotaxime*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

ESBL – β -laktamaze proširenog spektra (eng. *extended-spectrum β -lactamases*)

LB – Luria-Bertani agar

PBP – penicilin-vežući proteini (eng. *penicillin-binding protein*)

PCR – Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

UPOV – uređaj za pročišćavanje otpadnih voda

UV – ultraljubičasto svjetlo

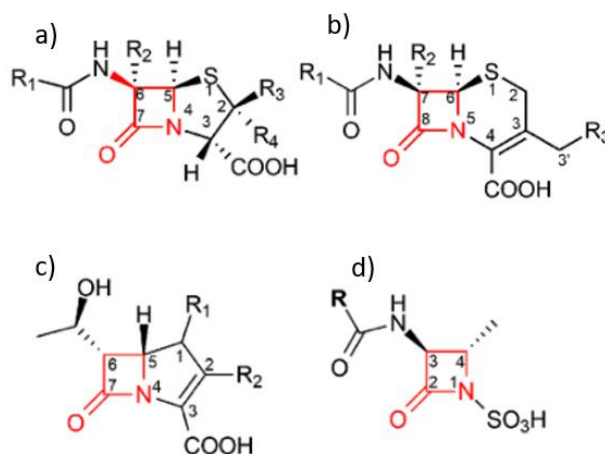
1. Uvod

Otkrićem arsfenamina 1909. od strane Paula Erlicha, koji je opazio da je taj spoj djelotvoran u suzbijanju sifilisa, započela je nova era u borbi protiv bolesti uzrokovanih bakterijama. Tek 1928. godine su antibiotici zaokupili pozornost znanstvenika i javnosti nakon što je Alexander Fleming slučajno kontaminirao kulturu bakterije *Staphylococcus* sp. sa gljivicom *Penicillium notatum* i otkrio da je gljivica inhibirala rast bakterije. Tako je otkrio penicilin koji je do drugog svjetskog rata postao prvi masovno proizveden i korišten antibiotik. Razdoblje 1950-ih i 1960-ih godina bilo je zlatno doba u otkrivanju novih antibiotika, od kojih se mnogi i danas koriste (polimiksini, kloramfenikol, tetraciklini, sve generacije cefalosporina, aminoglikozidi, vankomicin). Nažalost, ljudi su prekomjernom, pogrešnom ili nepotrebnom uporabom antibiotika, od početka masovne proizvodnje penicilina do danas, doveli do toga da je bakterijska otpornost na njih sve veći globalni problem u liječenju infektivnih bolesti kod ljudi i životinja (World Health Organisation, 2020.). No, prekomjerna uporaba antibiotika nije jedini faktor koji pospješuje stvaranje otpornih sojeva. Razvoju bakterijske otpornosti zasigurno je pridonijelo i prekomjerno ispuštanje antibiotika u okoliš kao i širenje otpornih sojeva u bolničkim i izvanbolničkim sredinama te njihovo ispuštanje u okoliš. Jedan od najvažnijih puteva širenja antibiotske otpornosti u okoliš jesu uređaji za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV-i) koji se smatraju „vrućim točkama“ za razvoj i širenje antibiotske otpornosti. Ovi uređaji prikupljaju urbane i ruralne otpadne vode koje čine velik udio ljudskog otpada. Te otpadne vode, osim mikrobiološkog onečišćenja, sadrže i organska onečišćenja poput antibiotika, dezinficijensa, biocida i farmaceutika koji, čak i pri niskim koncentracijama, mogu stvoriti selekcijski pritisak na bakterije i potaknuti ih na horizontalni prijenos gena (HGT). Ovaj proces dodatno pospješuje visoka koncentracija bakterija i njihov bliski kontakt u UPOV-ima. Zato se otpadne vode smatraju jednim od najvažnijih izvora otpornih bakterija koje se ispuštaju u okoliš i predstavljaju potencijalan put njihova širenja po cijelom ekosustavu.

1.1. β -laktamski antibiotici

β -laktamski antibiotici se koriste primarno u liječenju infekcija uzrokovanim Gram-negativnim bakterijama. Funkcionalnu skupinu im čini β -laktamski prsten ili azetidinon, odnosno ciklični amid sa dušikovim atomom vezanim za ugljik u β -položaju (Slika 1.). Postoje 4 skupine β -laktamskih antibiotika: penicilini, cefalosporini (1. – 5. generacije), karbapenemi i monobaktami. Spomenuti antibiotici djeluju na način da inhibiraju katalitičku aktivnost bakterijskih enzima transpeptidaza, koji se također nazivaju penicilin-vežući proteini (eng. *penicillin-binding protein*, PBP) i sudjeluju u završnim fazama sinteze peptidoglikana (Sauvage i sur., 2008.). Time remete pravilnu sintezu stanične stijenke bakterije i posljedično dovode do stanične smrti odnosno lize bakterijske stanice. Učinkovitost

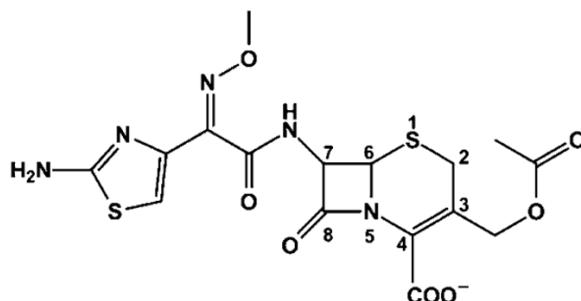
β -laktamskih antibiotika temelji se na strukturalnim, geometrijskim i stehiometrijskim sličnostima antibiotika i PBP-a (Lima i sur., 2020.).



Slika 1. Kemijska struktura a) penicilina, b) cefalosporina, c) karbapenema i d) monobaktama. Crvenom bojom je označeno aktivno mjesto molekule, odnosno β -laktamski prsten (De Rosa i sur., 2021.)

1.1.1. Cefalosporini treće generacije (3GC)

Prvi cefalosporin (cefalosporin C) izoliran je iz kulture gljivica *Cephalosporium acremonium* iz otpadnih voda 1948. godine (Lima i sur., 2020.), a najviše ih je otkriveno za vrijeme zlatnog doba antibiotika. Široka uporaba cefalosporina, zbog njihove učinkovitosti protiv niza bolesti, dovela je do izuma pet generacija cefalosporina (Metha i Sharma, 2016.). 3GC su učinkoviti u liječenju širokog raspona bolesti, a neki od njih su: cefotaksim (Slika 2.), ceftriakson, ceftazidim, ceftizoksim, cefoperazon, cefdinir, cefpodoksim, ceftizoksim i cefiksim (Arumugham i sur., 2022.). 3GC imaju visoku učinkovitost u borbi Gram-negativnih bakterija, te su izuzetno učinkoviti protiv Gram-negativnih stapčastih bakterija (Metha i Sharma. 2016.).

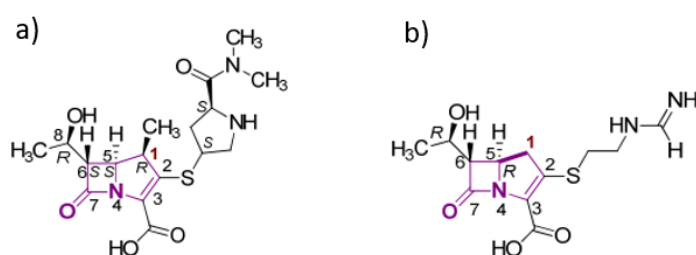


Slika 2. Molekularna struktura cefotaksima (Adamski i sur., 2014.)

1.1.2. Karbapenemi

Otpornost na 3GC dovela je do potrebe otkrivanja novijih i učinkovitijih skupina antibiotika. Karbapenemi su podskupina β -laktamskih antibiotika koji se zbog svog širokog spektra djelovanja najčešće koriste kao zadnja linija obrane protiv bolesti uzrokovanih višestruko otpornim Gram-negativnim bakterijama (Papp-Wallace i sur., 2011.), pogotovo infekcija koje uzrokuju enterobakterije koje proizvode β -laktamaze proširenog spektra (eng. *extended spectrum β -lactamases*, ESBL) (Karaiskos i sur., 2020.). Međutim, rastuća prevalencija tih infekcija dovela je do povećane uporabe karbapenema i posljedično pojave karbapenem-otpornih enterobakterija diljem svijeta (Nordmann i sur., 2009.). To predstavlja globalni zdravstveni rizik za ljude zbog smanjenog izbora antibiotika dostupnih za liječenje.

Molekularna struktura karbapenema je jedinstvena među β -laktamskim antibioticima. Funkcionalna skupina je skupina slična penicilinima, no atom sumpora na prvoj poziciji peteročlanog prstena je zamijenjen sa atomom ugljika, te imaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma, što stabilizira molekulu i poboljšava učinak antibiotika (Slika 3.) (El-Gamal i sur., 2017.; Jeon i sur. 2015.). Razlikuju se po lancu koji se veže na atom sumpora, a zbog veličine lanca molekule su nestabilne (Nicolau, 2008.). Stoga su do sad otkrivena samo četiri karbapenema: imipenem (Slika 3a), meropenem (Slika 3b), ertapenem i doripenem.



Slika 3. Kemijska struktura a) meropenema i b) imipenema (Lima i sur., 2020.)

1.2. Mehanizmi otpornosti bakterija na β -laktamske antibiotike

Bakterija koja je otporna na antibiotike ima sposobnost preživljavanja učinka određene koncentracije antibiotika u svom okolišu. Otpornost može biti urođena što znači da je bakterija otporna na antibiotik zbog svojih normalnih strukturnih ili fizioloških karakteristika. Također, otpornost može biti stečena što znači da se bakterija prilagodila nepovoljnim uvjetima kao što je prisutnost antibiotika nasumičnim mutacijama genoma, ili izmjenjivanjem genetskog materijala s drugim vrstama bakterija, odnosno HGT-om (van Hoek i sur., 2011.).

1.2.1. Mehanizmi otpornosti na β -laktamske antibiotike

Glavni mehanizam otpornosti na β -laktame u Gram-negativnih bakterija je proizvodnja enzima β -laktamaza koji inaktiviraju molekulu antibiotika hidrolizom β -laktamskog prstena. Nasuprot tome, Gram-pozitivne bakterije preferiraju modifikaciju ciljnih mjesta te skupine antibiotika (Malouin i Bryan, 1986.). Postoje dvije široko prihvaćene i korištene podjele β -laktamaza: 1) prema Ambleru (1980.) (dalje korištena podjela u ovom radu) u 4 molekularna razreda (A-D) gdje enzimi iz razreda A, C i D sadržavaju serin u aktivnom mjestu, dok se u aktivnom mjestu enzima iz molekularnog razreda B nalazi jedan ili dva cinkova iona (Walsh i sur., 2005.); 2) prema Bush i Jacoby (2010.) u 3 skupine (i njihove podskupine) gdje su β -laktamaze razvrstane prema funkcionalnim karakteristikama: cefalosporinaze, serinske β -laktamaze i metalo- β -laktamaze (eng. *metallo- β -lactamases*, MBL).

U sojeva otpornih na β -laktame koji ne proizvode β -laktamaze, otpornost može proizlaziti iz smanjene propusnosti bakterijske membrane ili veće ekspresije membranskih pumpi koje izbacuju molekulu antibiotika izvan stanice (Pagès i sur., 2008.; Nikaido, 2003.). Nakon što β -laktamski antibiotici prodru u periplazmatski prostor, vežu se za PBP-ove (koji sudjeluju u završnim fazama sinteze peptidoglikana) te ih inaktiviraju. Mehanizam izbacivanja antibiotika funkcionira na način da se prilikom povećanih koncentracija antibiotika unutar bakterije povećava ekspresija membranskih pumpi kako bi se koncentracija antibiotika smanjila (Li i Nikaido, 2009.; Poole, 2007.).

1.2.2. Otpornost na 3GC posredovana ESBL enzimima

Otpornost na 3GC u enterobakterija najčešće je posredovana ESBL enzimima koji hidroliziraju peniciline, cefalosporine i aztreonam (Chaudhary i Aggarwal, 2004.). Ove enzime inhibiraju inhibitori β -laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (Malloy i Campos, 2011.; Paterson i Bonomo, 2005.), a osjetljivi su na karbapeneme i cefamicine (Malloy i Campos, 2011.). ESBL-ovi su nastali kao posljedica točkastih mutacija gena za β -laktamaze smještenih na plazmidima koji su uvjetovali otpornost samo na peniciline i cefalosporine prve generacije. Primjer takve mutacije je mutacija unutar gena *bla_{SHV}* i *bla_{TEM}* čime su nastale mutirane varijante enzima koji zbog svog promijenjenog aktivnog mjesta mogu hidrolizirati 3GC (Paterson i Bonomo, 2005.). ESBL varijante SHV enzima detektirane su globalno u mnogim vrstama enterobakterija (Chanawong i sur., 2001.), u *P. aeruginosa* (Poirel i sur., 2004.) i u *Acinetobacter baumannii* (Huang i sur., 2004.). Prve opisane varijante TEM enzima bile su varijante TEM-1 i TEM-2 (Cantón i sur., 2008.), a do danas je poznato više od 200 ESBL varijanti TEM i 150 varijanti SHV enzima (Partridge, 2015.). Osim ESBL varijanti TEM i SHV enzima, u ESBL enzime ubrajaju se i β -laktamaze PER, VEB, GES i SME. PER (eng. *Pseudomonas extended resistant*, PER) je skupina β -laktamaza učestala kod *Pseudomonas* sp. koja dijeli sličnost od 25-26% s TEM i SHV enzimima (Bauernfeind i sur., 1996.). PER-2 je najznačajnija ESBL koja je prvobitno identificirana u *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, potom u *E. coli*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Proteus mirabilis* i *Vibrio cholerae* (Petroni i sur., 2002.), te *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (Potron i sur. 2015.). Zanimljivo je kako PER-2 nije globalno rasprostranjen, već geografski pripada Južnoj Americi (Potron i sur., 2015.). Slijedeća skupina ESBL-a, VEB (eng. *Vietnamese Extended-spectrum Beta-lactamase*, VEB) dijeli najveću homologiju, 38% aminokiselina, s ESBL varijantama PER-1 i PER-2 (Poirel i sur., 1999.), a hidroliziraju ceftazidim, cefotaksim i aztreonam, dok je učinak inhibiran klavulanskom kiselinom (Paterson i Bonomo, 2005.). Nadalje, manje zastupljeni ESBL-ovi od kliničkog značaja jesu SME (eng. *Serratia marcescens enzyme*, SME) i GES (eng. *Guyana extended-spectrum*, GES). Identificirane su 3 varijante SME enzima isključivo u *Serratia marcescens* koji se međusobno razlikuju u jednoj do dvije aminokiseline (Walther-Rasmussen i Høiby, 2007.). Geografski su ograničeni na područje Engleske i SAD-a (Queenan i Bush, 2007.). Slijedi GES, koji je uglavnom detektiran u Gram-negativnim bakterijama, uključujući *E. coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. Gore navedeni ESBL enzimi te dole spomenuti CTX-M spadaju u Amblerov molekularni razred A.

Najraširenija skupina ESBL enzima u svijetu je CTX-M (Pitout i Laupland, 2008.; Hawkey i Jones, 2009.; D'Andrea i sur., 2013.). Ova skupina je dobila ime po velikom afinitetu prema cefotaksimu. CTX-M enzimi nisu nastali mutacijama već poznatih β -laktamaza širokog spektra (TEM i SHV), već spadaju u nativne ESBL enzime koji potječu iz kromosomskih gena bakterija *Kluyvera* spp., okolišnih bakterija zanemarive kliničke važnosti (Decousser i sur., 2001.; Philippon, 2002.; Poirel i sur., 2002.b). CTX-M β -laktamaze dijele se u 5 skupina na temelju sličnosti u sekvenci aminokiselina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (skupina 1, 2, 8, 9 i 25) (D'Andrea i sur., 2013.; Jelić, 2018.). Slijed aminokiselina enzima unutar skupina preklapa se bar 94%, dok su enzimi između različitih CTX-M skupina slični do 90%, a sama CTX-M skupina dijeli sličnost do 40% sa TEM i SHV skupinama (Bonnet, 2004.; D'Andrea i sur., 2013.). Različite skupine CTX-M enzima su različito geografski zastupljene. Tako je npr. skupina CTX-M-1 (varijanta enzima CTX-M-15) najrasprostranjenija u Europi, Bliskom Istoku, Indiji i Sjevernoj Americi (Cantón i sur., 2012.; Bevan i sur., 2017.); skupina CTX-M-2 je učestala u Izraelu, Argentini i Japanu (Paterson i Bonomo, 2005.); CTX-M-9 (varijanta CTX-M-14) u južnoj Europi, jugoistočnoj Aziji i Kini (Paterson i Bonomo, 2005.).

1.2.3. Otpornost na karbapeneme posredovana karbapenemazama

Karbapenemaze su enzimi, β -laktamaze, koji hidroliziraju gotovo sve β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme. Iako mogu biti kodirani kromosomski, najčešće se geni za karbapenemaze nalaze na plazmidima. Prema Ambleru, dijele se na razrede A, B i D. U molekularnom razredu A opisano je 6 skupina karbapenemaza: KPC (eng. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), GES (eng. *Guyana extended-spectrum*), IMI/NMC-A (eng. *imipenem resistant/non-metallo carbapenemase-A*), SME, SFC-1 (eng. *Serratia fonticola carbapenemase*) i SHV-38 (Walther-Rasmussen i Høiby, 2007.; Bubonja-Šonje i Abram, 2014.). Prvi KPC enzim identificiran je 1996. godine na plazmidu *K.*

pneumoniae (Yigit i sur., 2001.), a kasnije su identificirani u *Enterobacter* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (Ahn i sur., 2014.; Robledo i sur., 2014.). KPC enzimi imaju sposobnost hidrolize penicilina, cefalosporina, aztreonama i karbapenema, također, *in vitro* pokusi su pokazali da vrše hidrolizu komercijalnih inhibitora (klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam) (Patel i Bonomo, 2013.).

Karbapenemaze molekularnog razreda B ili MBL hidroliziraju sve β -laktamzne antibiotike (pogotovo imipenem) osim aztreonama, te im aktivnost nije inhibirana komercijalnim inhibitorima (Patel i Bonomo, 2013.). Unutar ovog razreda klinički najznačajniji su: IMP (eng. *imipenemase*), VIM (eng. *Verona integron-encoded MBL*) i NDM (eng. *New Delhi MBL*) (Jelić, 2018.; Sawa i sur., 2020.). NDM-1 je prvi put izoliran iz *K. pneumoniae* u Švedskoj 2008. (Yong i sur. 2009.), a ubrzo nakon su NDM enzimi opisani u mnogim državama diljem svijeta. NDM enzime karakterizira otpornost na sve antibiotike osim polimiksina (Kumarasamy i sur., 2010.) i monobaktama (Nordmann i sur., 2011.). NDM su najučestaliji u *K. pneumoniae* i *E. coli*, ali su potvrđeni u raznim enterobakterijama te u *A. baumannii* (Kumarasamy i sur., 2010.) i *P. aeruginosa* (Jovcic i sur., 2011.). Najrašireniju skupinu MBL čini VIM, koji je detektiran diljem svijeta, ali endemičnost zadržava na području Italije i Grčke. Što se tiče IMP enzima, identificirano je preko 40 varijanti ovog enzima u mnogim Gram-negativnim bakterijama, uključujući razne rodove enterobakterija te *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens*, *Alcaligenes* spp., *Achromobacter xylosoxidans* (Walsh i sur., 2005.; Patel i Bonomo, 2013.).

Unutar molekularnog razreda D opisana je jedna iznimno heterogena skupina, OXA, koja je ime dobila po sposobnosti hidrolize oksacilina i kloksacilina. Pokazuje nisku razinu hidrolize cefalosporina proširenog spektra, aktivnost joj nije inhibirana komercijalnim inhibitorima (Nordmann i Poirel, 2014.). Prva otkrivena, i klinički najznačajnija, karbapenemaza ove skupine je OXA-48. Područje Bliskog Istoka i Sjeverne Afrike smatraju se prirodnim rezervoarom ovog enzima, a njegove varijante OXA-162 i OXA-244 su prisutne u Europi (Pitout i sur., 2019.).

1.3. Uloga plazmida u širenju otpornosti na 3GC

Širenje otpornosti na β -laktame najvećim je dijelom promovirano HGT-om između istih ili različitih vrsta bakterija, odnosno izmjenjivanjem gena otpornosti putem plazmida. Plazmidi su nekromosomske, kružne dvolančane molekule DNA u bakterijskoj stanici koje imaju sposobnost autonomne replikacije (Jelić, 2018.). Plazmidi često posjeduju više gena koji kodiraju otpornost na različite skupine antibiotika što dovodi do ispoljavanja višestruko otpornih fenotipova (Carattoli, 2013.; Mathers i sur., 2015.). Plazmidi se klasificiraju u tzv. skupine inkompatibilnosti (eng. *incompatibility group*, Inc) na temelju tipa replikona, odnosno konzervirane regije s ključnom ulogom u procesu replikacije (Carattoli, 2013.). Dije se u dvije skupine ovisno o spektru bakterijskih domaćina: uski

bakterijski spektar (IncF) i široki bakterijski spektar (IncL/M, IncA/C, IncN) (Mathers i sur., 2015.). U slučaju da unutar iste stanice postoje dva plazmida koja ometaju replikaciju jedan drugom, smatra se da su inkompatibilni (Novick, 1987.; Carattoli, 2013.). Standardizirana metoda koja se koristi u identifikaciji replikona u enterobakterija i bakterija roda *Acinetobacter* je tipizacija replikona lančanom reakcijom polimeraze (eng. *PCR-based replicon typing*, PBRT) (Carattoli i sur., 2005.), a klinički najznačajnije Inc skupine su IncF, IncA/C, IncI, IncHI, IncN i Inc L/M (Carattoli i sur., 2015.; Jelić, 2018.).

Važan čimbenik u širenju gena koji kodiraju ESBL i karbapenemaze su veliki konjugativni plazmidi (Carattoli, 2013.). Plazmidi koji nose gene za ESBL enzime pripadaju različitim Inc skupinama, npr. geni za enzim CTX-M-15 se najčešće nalaze na IncF plazmidima (Branger i sur., 2018.), a geni za CTX-M-14 na IncK plazmidima (Rozwandowicz i sur., 2018.). Geni za karbapenemazu OXA-48 u pravilu se nalaze na IncL/M plazmidima (Poirel i sur., 2012.), i to često sa ESBL genima (*bla*_{CTX-M}-1, -3, -15, *bla*_{TEM}-10, -52, *bla*_{SHV-2}) kao i karbapenemaznim genom *bla*_{NDM} (Khan i sur., 2017.; Rozwandowicz i sur., 2018.). Nadalje, na IncN plazmidima detektirani su ESBL i karbapenemazni geni npr. *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{VIM-1} (Rozwandowicz i sur., 2018.). Osim toga, geni koji kodiraju VIM enzime detektirani su i na plazmidima koji pripadaju skupinama IncF, IncA/C, IncR, IncHI2, IncI1 i IncW (Martínez-Martínez i González-López, 2014.).

1.4. Uloga uređaja za pročišćavanje otpadnih voda kao put širenja otpornosti

Otpadne vode (gradske, industrijske, bolničke, poljoprivredne) prije vraćanja u okoliš bivaju pročišćene u UPOV-ima. Prema tome, u takva postrojenja bakterije iz različitih izvora dolaze u bliski kontakt s drugim bakterijama (npr. ljudskim patogenima) s kojima mogu razmjenjivati genetski materijal, uključujući gene za otpornost na antibiotike, putem HGT-a (Karkman i sur., 2018.). Osim toga, prisutnost antibiotika i drugih spojeva poput dezinficijensa ili teških metala u otpadnim vodama može djelovati selektivno na bakterijsku zajednicu potičući HGT i posljedično širenje otpornosti unutar zajednice (Karkman i sur., 2018.). Taj proces je dodatno olakšan visokom koncentracijom bakterija i njihovim bliskim kontaktom te visokom koncentracijom hranjiva (Manaia i sur., 2018.). Iz gore navedenih razloga se UPOV-i smatraju „vrućim točkama“ ili žarištima za razvoj i širenje antibiotske otpornosti među bakterijama (Michael i sur., 2013.; Guo i sur., 2017.). Analizom otpornih bakterija u sirovim i pročišćenim otpadnim vodama može se procijeniti djelotvornost tretmana njihova uklanjanja u UPOV-ima te procijeniti rizik njihova prijenosa u okoliš. Širenje antibiotski otpornih bakterija u okoliš putem pročišćenih otpadnih voda predstavlja potencijalnu prijetnju ekosustavu zbog širenja gena otpornosti na okolišne bakterije, uključujući i patogene (Munck i sur., 2015.). Putevi kojima ljudi mogu doći u kontakt s tim otpornim bakterijama su brojni. Oni uključuju direktni kontakt sa pročišćenom

otpadnom vodom, npr. kupanjem, te konzumacijom sirovog voća i povrća koje je prethodno zalijeivano s pročišćenom otpadnom vodom.

Geni za ESBL su detektirani unutar UPOV-a diljem Europe i svijeta. Najčešći tip ESBL enzima je ranije spomenuti CTX-M koji je detektiran u većini proučavanih izolata enterobakterija iz UPOV-a (Zaatout i sur., 2021.). Također, nedavno istraživanje Puljko i suradnika (2022.) je pokazalo da različiti UPOV-i u RH ne smanjuju nužno količine gena za ESBL i karbapenemaze, štoviše, njihove koncentracije su ponekad bile više u pročišćenoj nego u sirovoj otpadnoj vodi uređaja. To može biti rezultat selekcije otpornih sojeva putem HGT-a ili namnožavanja sojeva s tim genima tijekom samog postupka pročišćavanja otpadne vode u uređaju (Puljko i sur., 2022.). S obzirom da vodeni okoliš u koji se ispuštaju pročišćene otpadne vode predstavlja povoljne uvjete za HGT, otpornost na 3GC i karbapeneme se preko odgovarajućih gena lako može proširiti ekosustavom i potencijalno natrag na ljude.

2. Ciljevi istraživanja

Kako zasad još nisu provedena istraživanja o HGT za otpornost na 3GC između bakterija koje obitavaju u otpadnim vodama u Republici Hrvatskoj, cilj ovog rada je istražiti plazmidni prijenos ESBL gena direktno iz uzoraka pročišćenih komunalnih otpadnih voda u modelnu bakteriju primatelj *E. coli* CV601. Karakterizacija mobilnih plazmida koji nose te gene pružit će uvid u širenje otpornosti na 3GC i potencijalno druge klase antibiotika između bakterija u pročišćenim otpadnim vodama, što naposljetku može dovesti do povećanja udjela bakterija otpornih na antibiotike u cijelom ekosustavu.

3. Materijali i metode

3.1. Popis materijala

3.1.1. Uzorci otpadne vode i bakterije primatelji

Uzorci pročišćenih komunalnih otpadnih voda prikupljeni su tijekom ljeta 2020. godine iz UPOV-a sedam gradova Hrvatske: Bjelovar, Čakovec, Karlovac, Varaždin, Vinkovci, Zadar i Zagreb. Na svakom uređaju kompozitni uzorci (uzeti u razdoblju od 24h, volumena 250-400 mL) su prikupljeni tri uzastopna dana te odmah profiltrirani kroz membranske filtere (GE Healthcare LifeSciences Whatman, Njemačka) promjera 47 mm i širine pora 0.2 μm metodom membranske filtracije radi

koncentriranja biomase bakterija iz cjelokupnog uzorka. Filteri su zatim usitnjeni sterilnim škarama i ubačeni u otopinu sačinjenu od 10%-tnog triptoza sojinog bujona (eng. *Tryptic soy broth* – Difco, Francuska) i 25%-tnog glicerola (Gram Mol, Hrvatska) te pohranjeni na -80 °C do daljnje obrade.

Bakterija primatelj u pokusima egzogene izolacije plazmida je soj *E. coli* CV601 *gfp*⁺. To je genetski modificiran soj koji sadržava gen za zeleni fluorescirajući protein (eng. *green fluorescence protein* – GFP) pa kolonije ovog soja pod UV svjetlom fluoresciraju zeleno. Osim toga, ovaj soj je otporan na antibiotike kanamicin i rifampicin.

3.1.2. Antibiotici

- Kanamicin-monosulfat (KAN) (ThermoScientific, Njemačka).
Prašak 100% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te su napravljene izvorne otopine koncentracije 50 mg/mL. Radna otopina je napravljena razrjeđivanjem izvorne otopine do koncentracije od 5 mg/mL. Alikvot radne otopine je dalje dodan u hranjive podloge kako bi se dobila konačna koncentracija u podlozi od 50 mg/L.
- Rifampicin (RIF) (TCI, Japan)
Prašak >98% čistoće je otopljen u etanolu (100%, GramMol, Hrvatska) te su napravljene izvorne otopine koncentracije 50 mg/mL. Radna otopina je napravljena razrjeđivanjem izvorne otopine do koncentracije od 5 mg/mL. Alikvot radne otopine je dalje dodan u hranjive podloge kako bi se dobila konačna koncentracija u podlozi od 50 mg/L.
- Cikloheksimid (CHX) (Sigma-Aldrich, Kina)
Prašak ≥94% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te su napravljene izvorne otopine koncentracije 10 mg/mL. Radna otopina je napravljena razrjeđivanjem izvorne otopine do koncentracije od 1 mg/mL. Alikvot te otopine je dalje dodan u hranjive podloge kako bi se dobila konačna koncentracija u podlozi od 100 mg/L.
- Cefotaksim (CXT) (Sigma-Aldrich, Izrael)
Prašak 100% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te su napravljene izvorne otopine koncentracije 5 mg/mL. Radna otopina je napravljena razrjeđivanjem izvorne otopine do koncentracije od 1 mg/mL. Alikvot te otopine je dalje dodan u hranjive podloge kako bi se dobila željena koncentracija od 2 mg/L.
- Kolistin sulfat (COL) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
Prašak 100% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te je napravljena radna otopina koncentracije 1 mg/mL koja je dalje razrijeđena do nižih koncentracija za potrebe ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodom mikrodilucije u Mueller-Hintonovom bujonu II.
- Meropenem (MEM) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Prašak 100% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te je napravljena radna otopina koncentracije 1 mg/mL koja je dalje razrijeđena do nižih koncentracija za potrebe ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodom mikrodilucije u Mueller-Hintonovom bujonu.

- Imipenem (IMP) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Prašak 100% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te je napravljena radna otopina koncentracije 1 mg/mL koja je dalje razrijeđena do nižih koncentracija za potrebe ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodom mikrodilucije u Mueller-Hintonovom bujonu.

- Ertapenem (ETP) (Carbosynth Ltd., UK)

Prašak 85% čistoće je otopljen u miliQ H₂O te je napravljena radna otopina koncentracije 1 mg/mL koja je dalje razrijeđena do nižih koncentracija za potrebe ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodom mikrodilucije u Mueller-Hintonovom bujonu.

Izvorne otopine antibiotika KAN, CTX, MEM, IPM i ETP te antimikotika CHX pripremljene su otapanjem praška antibiotika ili antimikotika u miliQ H₂O, zatim filtrirani kroz filter (Filtropur S 0.2, Sarstedt, Njemačka) pomoću štrcaljke (BD Discard™, Španjolska) od 20 mL. Izvorna otopina antibiotika RIF pripremljena je otapanjem praška u 100% metanolu (GramMol, Hrvatska). Tako pripremljene izvorne otopine su pohranjene na -20 °C.

KAN i RIF su korišteni kako bi se selektirao soj bakterije primatelj na hranjivoj podlozi. CHX je antimikotik korišten za inhibiciju rasta gljivica na hranjivim podlogama. CTX je odabran kao predstavnik 3GC za praćenje prijenosa otpornosti na tu skupinu antibiotika.

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Priprema krute Luria-Bertani (LB) hranjive podloge sa i bez dodatka antibiotika

Kruta Luria-Bertani hranjiva podloga pripremljena je dodavanjem 25 g LB bujona (Difco, Francuska) i 15 g agara (Biolife, Italia) u 1 L destilirane vode. Otopina je potom autoklavirana na 121 °C 15 minuta. Podloge su nakon autoklaviranja ohlađene na 50 – 55 °C, zatim su, u sterilnim uvjetima laminara (LN 090-120, Kompass, Turska), u podlogu dodani slijedeći antibiotici i/ili antimikotik CHX: CTX (2 mg/L) (LB+CTX₂); KAN (50 mg/L) i RIF (50 mg/L) (LB+KAN₅₀+RIF₅₀); CHX (100 mg/L) (LB+CHX₁₀₀); KAN (50 mg/L), RIF (50 mg/L) i CHX (100 mg/L) (LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀); KAN (50 mg/L), RIF (50 mg/L) CTX (2 mg/L) (LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CTX₂); KAN (50 mg/L), RIF (50 mg/L), CHX (100 mg/L) i CTX (2 mg/L) (LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂).

3.1.3.2. Priprema 10%-tnog triptoza sojinog bujona (eng. *tryptic soy broth*, TSB)

U 1 L destilirane vode dodano je 4 g TSB-a (Difco, Francuska). Otopina je zatim sterilizirana u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

3.1.3.3. Priprema Mueller-Hintonovog agara (MHA)

U 1 L destilirane vode dodano je 38 g Mueller-Hintonove čvrste podloge (OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo). Otopina je zatim sterilizirana u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

3.1.3.4. Priprema Mueller-Hintonovog bujona

U 1 L destilirane vode dodano je 21 g Mueller-Hintonovog bujona (Merck, Njemačka). Otopina je zatim sterilizirana u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

3.1.3.5. Priprema Mueller-Hintonovog bujona II

U 1 L destilirane vode dodano je 22 g Mueller Hintonovog bujona II (s podešenim kationima; Sigma-Aldrich, Njemačka). Otopina je zatim sterilizirana u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

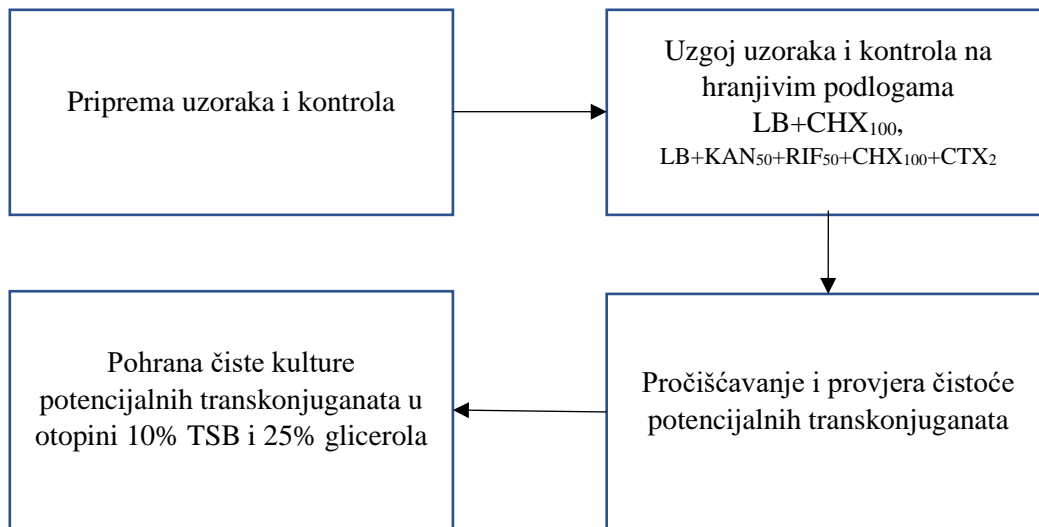
3.1.4. Priprema agaroznog gela

Za elektroforezu je pripremljen agarozni gel (1,5%) s TAE puferom (UltraPure™ 10x TAE Buffer, Thermo Fisher Scientific, Litva) koji je prethodno razrijeđen sa 10x na 1x u destiliranoj vodi. U 1x TAE puferu (150 mL) je otopljeno 2,25 g agaroze (Sigma, SAD) u mikrovalnoj pećnici te je nakon hlađenja na oko 60 °C u otopinu agaroze dodan etidijev bromid (0,5 µg/mL) koji interkalira između baza u molekuli DNA te zbog toga DNA možemo vizualizirati pod UV svjetlom. Otopina agaroze je potom izlivena na nosač i nakon otprilike 20 minuta polimerizirani gel je uronjen u kadicu za elektroforezu s 1x TAE puferom.

3.1.5. Priprema fiziološke otopine

Fiziološka otopina (0,85% NaCl) je pripremljena otapanjem 8,5 g NaCl u 1 L miliQ H₂O i zatim sterilizirana u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 min.

3.2. Egzogeno izolacija plazmida koji nose gene za otpornost na cefotaksim



Slika 4. Shematski prikaz metode egzogene izolacije plazmida

Na Slici 4. su shematski prikazani postupci u pokusima egzogene izolacije plazmida koji su detaljnije opisani u potpoglavljima koji slijede (3.2.1., 3.2.2. i 3.2.3.).

3.2.1. Priprema uzoraka i kontrola

Bakterija primatelj, *E. coli* CV601, je iz glicerolne kulture naciepljena na krutu podlogu LB+KAN₅₀+RIF₅₀ i stavljena na inkubaciju preko noći na 28 °C. Jedna kolonija porasla na podlozi LB+KAN₅₀+RIF₅₀ precijepljena je pomoću eze u 10 mL tekuće TSB podloge koja je sadržavala KAN (50 mg/L) i RIF (50 mg/L). Tako naciepljena podloga inkubirana je na tresilici preko noći na 28 °C/180 rpm. Po 2 mL prekonnoćne kulture pipetirano je u endorfovnu tubicu i centrifugirano 10 minuta pri 5000rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a pelet ispran s 1 mL 10%-tnog TSB-a. Postupak je ponovljen još dva puta kako bi se pelet bakterije primatelj isprao od zaostalih antibiotika. Nakon zadnjeg centrifugiranja, bakterijski pelet je resuspendiran u 1 mL 10%-tnog TSB-a. Dobivena bakterijska suspenzija bakterije primatelj (*E. coli* CV601) koristila se u daljnjem pokusu te je označena kao RC (eng. *recipient control*).

Uzorci pročišćene komunalne otpadne vode su služili kao davatelji plazmida u pokusima egzogene izolacije plazmida. Filter svakog uzorka (u 10%-tnom TSB-u i 25%-tnom glicerolu; Poglavlje 3.1.1.) je postupno odmrznut sa -80 °C i potom stavljen na tresilicu na 60 rpm pri 28°C 2 sata. Zatim je po 3 mL te otopine prebačeno u dvije falkonice od 50 mL. Jedna je označena kao kontrola uzorka – SC (eng. *sample control*), dok je u drugu dodan pripremljeni RC (75 µL) te je označena kao SM (eng. *sample mix*). SC, SM, i ostatak RC-a centrifugirani su pri 3100 rpm/10 minuta, supernatant je odbačen, a pelet resuspendiran u 100 µL 10%-tnog TSB-a.

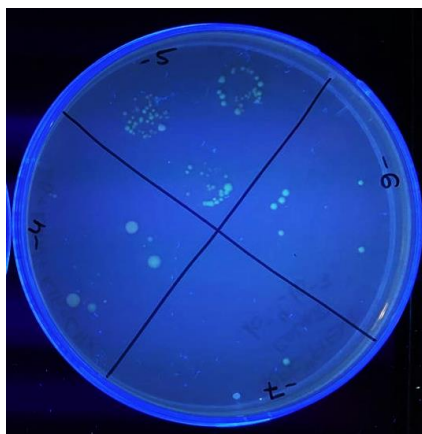
3.2.2. Prijenos plazmidne DNA iz bakterija davatelj u bakteriju primatelj konjugacijom

Na sredinu prethodno pripremljene krute hranjive podloge LB+CHX₁₀₀ stavljen je filter (GE Healthcare LifeSciences Whatman, Njemačka) na kojeg je pipetirano po 100 μ L uzorka SM (mješavina bakterija davatelj i primatelj) i odgovarajućih kontrola SC i RC kao što je prikazano na Slici 5. Hranjive podloge s filterima inkubirane su na 28 °C, preko noći.



Slika 5. Petrijeve zdjelice sa LB+CHX₁₀₀ i naraslim kolonijama bakterija na filteru (autorska fotografija)

Nakon prekonodne inkubacije, filteri su prebačeni u 2 mL 0,85% NaCl u falkonicama od 50 mL. Vorteksiranjem sadržaja falkonica, bakterijske stanice su odvojene s filtera. Kako bi se odredio broj potencijalnih transkonjuganata i broj stanica bakterije primatelj, pripremljena su decimalna razrjeđenja suspenzije SM od 10^{-1} do 10^{-3} i suspenzije RC od 10^{-1} do 10^{-7} . U ependorfovnu tubicu od 1,5 mL je stavljeno 900 μ L 0,85% NaCl i 100 μ L suspenzije SM odnosno RC i na taj način je pripremljeno prvo decimalno razrjeđenje. Zatim je tubica s prvim decimalni razrjeđenjem vorteksirana te je iz nje uzeto 100 μ L i preneseno u novu tubicu sa sterilnom otopinom 0,85% NaCl (900 μ L) i time je pripremljeno drugo decimalno razrjeđenje. Takvim postupkom pripremljeno je prvih sedam decimalnih razrjeđenja za uzorak RC odnosno tri decimalna razrjeđenja za uzorak SM. Po 100 μ L 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} razrjeđenja uzorka SM nacijepljeno je u duplikatu na krute hranjive podloge LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ (González-Plaza i sur., 2019.). Kontrolama SC i RC uzet je volumen od 50 μ L i nacijepljen na iste hranjive podloge. Što se tiče određivanja broja stanica bakterije primatelj u suspenziji RC, korištene su krute podloge LB+KAN₅₀+RIF₅₀. Petrijeve zdjelice s tom podlogom su prvo na poleđini podijeljene u četiri kvadranta (svaki odgovara jednom razrjeđenju) (Slika 6.), a potom je u svaki kvadrant nacijepljeno po 20 μ L 10^{-1} do 10^{-7} razrjeđenja u tri paralele. Sve nacijepljene hranjive podloge stavljene su na inkubaciju 48h na 28 °C, a potom su porasle stanice prebrojane pod UV svjetlom te je izračunat broj stanica potencijalnih transkonjuganata u početnoj suspenziji SM i stanica bakterije primatelj u suspenziji RC. Učestalost transkonjugacije je izračunata pomoću formule: CFU mL⁻¹ transkonjuganata / CFU mL⁻¹ bakterije primatelj.

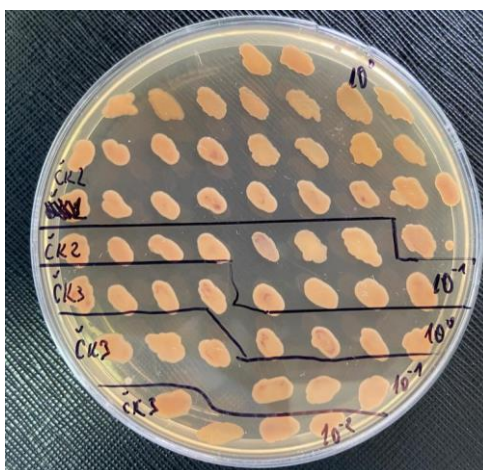


Slika 6. Prikaz inokuliranih razrjeđenja suspenzije bakterije primatelj (svako razrjeđenje u jednom kvadrantu) pod UV svjetlom nakon 24h inkubacije (autorska fotografija)

Bakterije iz RC uzorka nisu narasle na hranjivoj podlozi LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂, jer je bakterija primatelj osjetljiva na antibiotik CTX. Kontrola SC je služila kao potvrda da u uzorku otpadne vode ima bakterija otpornih na CTX koje mogu poslužiti kao potencijalni davatelji plazmida s genima otpornosti na CTX. Bakterije iz SM uzorka porasle na podlozi LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂, a koje su emitirale zelenu fluorescenciju označene su kao potencijalni transkonjuganti.

3.2.3. Pročišćavanje i pohrana potencijalnih transkonjuganata

Označene kolonije su zatim precijepljene ezom na novu podlogu LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ (Slika 7.) te su stavljene na inkubaciju 48h na 28 °C.



Slika 7. Prikaz precijepljenih kolonija potencijalnih transkonjuganata na krutu hranjivu podlogu LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ (autorska fotografija)

Nakon 48h inkubacije, petrijeve zdjelice s potencijalnim transkonjugantima ponovo su promatrane pod UV svjetlom na transiluminatoru radi potvrde emisije fluorescencije. Porasle kolonije koje su svijetlile zeleno precijepljene su na nove podloge LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CHX₁₀₀+CTX₂ metodom iscrpljivanja radi dobivanja čiste kulture te povećanja biomase. Nacijepljene podloge su potom stavljene na inkubaciju 48h na 28 °C. Metoda iscrpljivanja je ponovljena po potrebi do dobivanja čiste kulture.

Za provjeru čistoće kulture, bakterije su obojane safraninom (Biogram 4 kit, Biognost, Hrvatska) i gledane pod mikroskopom (Wild M20EB, Wild Heerbrugg, Švicarska) pod povećanjem od 1000x. Čiste kulture potencijalnih transkonjuganata (n=76) precijepljene su ezom s krutih podloga u petrijevim zdjelicama u 2 mL tekuće hranjive podloge LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CTX₂ u falkonicama od 10 mL. Falkonice su potom stavljene na inkubaciju 48h na 28 °C. Nakon inkubacije pripremljena je glicerolna otopina bakterijske kulture miješanjem 900 µL bakterijske kulture potencijalnog transkonjuganta i 900 µL 50% glicerola (GramMol, Hrvatska). Glicerolna otopina bakterijske kulture smrznuta je na -20 °C do daljnje analize.

3.3. Izolacija ukupne bakterijske DNA iz potencijalnih *E. coli* transkonjuganata

U ependorfove tubice od 1,5 mL pipetirano je 50 µL vode bez nukleaza (Qiagen, Njemačka) i u njoj suspendirana 1 kolonija potencijalnog transkonjuganta prikupljena sterilnom ezom sa LB+CTX₂ podloge. Kako bi došlo do lize bakterijskih stanica i oslobađanja DNA, ependorfove tubice su stavljene u termoblok (Corning® LSE™, Kanada) 10 minuta na 99 °C. Volumen od 1 µL bakterijske suspenzije je dalje korišten u PCR smjesi u Poglavlju 3.4.

3.4. Detekcija pozitivnih transkonjuganata pomoću metoda lančane reakcije polimerazom s početnicom BOX i agarozne gel elektroforeze

Za potvrdu da je potencijalni transkonjugant zaista bakterija primatelj *E. coli* CV601 s plazmidom koji nosi gen za otpornost na CTX, korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) ponavljajućih sljedova koristeći početnicu BOX, tzv. BOX-PCR i agarozna gel elektroforeza za analizu produkata BOX-PCR reakcije. Metoda BOX-PCR-a uključuje korištenje samo jedne početnice BOX_A1R (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG) koja se veže na raspršene BOX sekvence što rezultira da se tijekom PCR-a umnaža više fragmenata različite veličine što daje odgovarajući DNA profil tzv. *fingerprint* specifičan za pojedinu vrstu bakterija (Martin i sur., 1992.). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sastoji se od komponenata u odgovarajućim omjerima navedenim u Tablici 1. Pozitivna kontrola je rađena sa DNA kalupom *E. coli* CV601, dok je

negativna kontrola sadržavala sve sastojke reakcijske smjese osim DNA, umjesto koje se nalazila voda bez nukleaza.

Tablica 1. Sastav BOX-PCR reakcijske smjese

Sastojak	V (μL)	c (konačne smjese)
Voda bez nukleaza (Qiagen, Njemačka)	10,75	/
10X pufer (Thermo Scientific, Litva)	5	1X
Mješavina deoksinukleozid-trifosfata (Thermo Scientific, Litva)	2,5	0,2 mM
25 mM MgCl_2 (Thermo Scientific, Litva)	3,75	3,75 mM
DMSO	1,25	5%
Početnica BOX_A1R	0,5	0,2 μM
Taq polimeraza (Thermo Scientific, Litva)	0,25	1,25 U/A
DNA kalup	1	/
Ukupni volumen	25 μL	

Reakcija umnažanja DNA provedena je na PCR uređaju (PCRmax Alpha Cycler 1 Thermal Cycler, Cole-Palmer, SAD) u slijedećim uvjetima:

- Početna denaturacija DNA kalupa i aktivacija polimeraze – 94 °C, 7:00 min
- 30 ciklusa
 - Denaturacija DNA kalupa - 94 °C, 1:00 min
 - Sparivanje DNA kalupa s početnicama – 53 °C, 1:00 min
 - Sinteza komplementarnog DNA lanca - 65 °C, 8:00 min
- Završna elongacija – 65 °C, 16:00 min

Agarozna gel elektroforeza napravljena je nanošenjem dobivenih PCR produkta (10 μL) prethodno pomiješanih s 2 μL boje (Gel loading solution, Sigma, SAD) u jažicu 1,5% agaroznog gela (priprema opisana u Poglavlju 3.1.3.). Osim toga, u prvu, srednju i zadnju jažicu gela nanoseno je 2 μL DNA markera (BenchTop, 1kb DNA Ladder, Promega, SAD), raspona molekularne mase 0,25 – 10 kilobaza (kb), za identifikaciju veličine pojedinog produkta. Elektroforeza se provodila pri naponu od 40 V kroz 4h. Gel je nakon provedene elektroforeze stavljen na transiluminator kako bi se PCR produkti vizualizirali pod UV svjetlom. Transkonjuganti koji su imali DNA fragmente iste kao pozitivna kontrola (*E. coli* CV601) smatrani su pozitivnim transkonjugantima tj. *E. coli* koja je primila plazmid s genom za otpornost na CTX iz bakterije iz uzorka pročišćenih komunalnih otpadnih voda. Ti transkonjuganti su išli na daljnju obradu.

3.5. Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike metodom disk difuzije

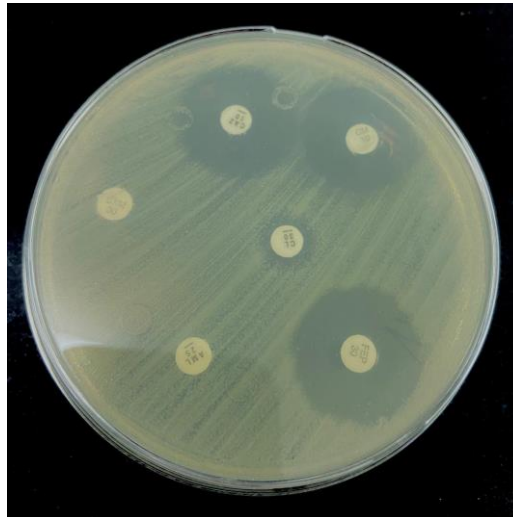
Osjetljivost transkonjuganata na antibiotike ispitivala se metodom disk difuzije prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, 2023.*). Ispitana je osjetljivost na 13 antibiotika koji spadaju u slijedeće skupine: penicilini (AMC - amoksicilin, AML – amokslicilin/klavulanska kiselina), cefalosporini prve generacije (CL - cefaleksin), cefalosporini druge generacije (CXM - cefuroksim), cefalosporini treće generacije (CAZ - ceftazidim, CTX - cefotaksim), cefalosporini četvrte generacije (FEP - cefepim), karbapenemi (ETP - ertapenem, IPM - imipenem, MEM - meropenem), aminoglikozidi (GM - gentamicin), sulfonamidi (SXT – trimetoprim/sulfometaksazol) i fluorokinoloni (CIP - ciprofloksacin).

Transkonjuganti su naciepljeni na hranjivu podlogu LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CTX₂ i inkubirani na 28 °C preko noći. Iz pojedinog transkonjuganta te kontrolnih sojeva *E. coli* (CV601, ATCC 25922 i NCTC 13846) pripremljeno je po 2 mL suspenzije gustoće 0,5 McFarlanda što približno odgovara broju od 10⁸ stanica po mL, tako što su kolonije pojedinog transkonjuganta ezom prebačene sa LB+KAN₅₀+RIF₅₀+CTX₂ u sterilnu epruvetu s 5 mL vode bez nukleaza. Gustoća bakterijske suspenzije je očitana na denzitometru DEN-1B (Suspension Turbidity Detector DEN-1, Biosan, Latvija). Pripremljene su MHA podloge (Potpoglavlje 3.1.3.3.) na koje je zatim vatenim štapićem ravnomjerno nanosena homogenizirana bakterijska suspenzija razmazivanjem u tri smjera. Na podloge su potom postavljeni diskovi antibiotika pomoću disk dispensera („BLL Sensi Disc 8 Place Dispenser“ BD BLLTM, SAD). Podloge su potom stavljene u inkubator preko noći na 35 °C nakon čega su izmjereni promjeri zona inhibicije bakterijskog rasta (Slika 8.) i uspoređeni s EUCAST-ovom tablicom za očitavanje osjetljivosti na antibiotike (EUCAST, 2023.). Diskovi antibiotika korišteni za ispitivanje osjetljivosti su:

- AMC30 (BD BBL™, SAD)
- AML25 (OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- CL30 (OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- FEP30 (BD BBL™, SAD)
- CTX5 (BD BBL™, SAD)
- CXM30 (BD BBL™, SAD)
- CAZ10 (OXOID, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ETP10 (BD BBL™, SAD)
- IPM10 (BD BBL™, SAD)
- MEM10 (BD BBL™, SAD)
- GM10 (BD BBL™, SAD)

- SXT (BD BBL™, SAD)
- CIP5 (BD BBL™, SAD)

Brojke pored kratice antibiotika označavaju koncentraciju u disku, izraženu u mg/L.



Slika 8. Primjer disk difuzijskog testa gdje se mjerio promjer zone inhibicije bakterijskog rasta oko antibiotičkog diska na krutom Mueller-Hinton agaru (autorska fotografija)

3.6. Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na karbapeneme i kolistin (COL) metodom mikrodilucije

Transkonjuganti koji su pokazali otpornost na karbapenemske antibiotike (ETP, IPM i/ili MEM) metodom disk difuzije (Poglavlje 3.5.) su podvrgnuti dodatnom ispitivanju osjetljivosti na ove antibiotike metodom mikrodilucije u Mueller-Hintonovom bujonu sukladno EUCAST preporuci (EUCAST, 2023.). Osim toga, ovom metodom je svim transkonjugantima ispitana i osjetljivost na COL. Korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica. U prvi red jažica pipetirano je po 190 μ L otopine karbapenemskog antibiotika u Mueller-Hintonovom bujonu koncentracije 64 mg/L (IPM, MEM) ili 16 mg/L (ETP), a u sve druge jažice po 90 μ L Mueller-Hintonovog bujona. U slučaju COL korišten Mueller-Hintonov bujon II i njegova početna koncentracija (u prvoj jažici) bila je 64 mg/L. Potom su pripremljena dvostruka serijska razrjeđenja antibiotika na način da je po 100 μ L otopine pipetirano iz jažica 1. reda u jažice 2. reda pločice te se postupak ponavljao još četiri puta. Dobiveni raspon koncentracija IPM, MEM i COL bio je od 1 do 64 mg/L, dok je koncentracija ETP bila u rasponu od 0,25 do 16 mg/L.

Inokulum je pripremljen na način da je pojedinačna kolonija ispitivanog *E. coli* transkonjuganta nacijepljena u Mueller-Hintonov bujon (2 mL) za prekonoćnu inkubaciju u tresilici na 37 °C uz vrtnju (150 rpm). Gustoća bakterijskih suspenzija je potom očitana na spektrofotometru (UV-1280, Shimadzu,

Japan) pri valnoj duljini od 600 nm te razrijeđena u Mueller-Hintonovom bujonu do gustoće koja je odgovarala koncentraciji od 5×10^5 CFU/mL. U svaku jažicu mikrotitarske pločice, osim u jažice s negativnom kontrolom, pipetirano je po 10 μ L pripremljenog inokuluma. Negativna kontrola uključivala je bujon bez antibiotika i inokuluma te ne smije biti zamučena da bi rezultati bili valjani. Kontrola rasta bakterija je uključivala bujon bez antibiotika s analiziranim *E. coli* transkonjugantom i ona mora biti zamučena da bi ostali rezultati bili valjani. Osim toga, kontrolni sojevi *E. coli* (ATCC 25922 i NCTC 13846) pripremljeni su na isti način kao i analizirani *E. coli* transkonjuganti na zasebnoj mikrotitarskoj pločici. Mikrotitarske pločice inkubirane su u termostatu na 35 °C tijekom 18h. Koncentracija pojedinog antibiotika iz prve jažice u kojoj se ne vidi zamućenje odgovarala je minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK), odnosno koncentraciji antibiotika pri kojoj dolazi do potpune inhibicije rasta bakterija.

3.7. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolirana je prema protokolu proizvođača koristeći reagens komercijalnog Plasmid mini prep kit-a (Qiagen, Njemačka). U ependorfove tubice od 1,5 mL pipetirano je po 900 μ L tekuće LB+CTX₂ i 100 μ L glicerolne kulture pojedinog transkonjuganta, potom su tubice stavljene na inkubaciju preko noći na 28 °C. Te su prekončne kulture zatim centrifugirane na 10000 rpm 3 minute, nakon čega je supernatant odbačen. Pelet stanica je resuspendiran u 250 μ L Pufera P1 (Qiagen, Njemačka) u kojeg je prethodno dodana RNaza A (Merck, Njemačka). Zatim je dodano 250 μ L Pufera P2 (Qiagen, Njemačka) te su tubice ručno promiješane. Nakon 5 minuta dodano je 350 μ L Pufera N3 (Qiagen, Njemačka) te 100 μ L kloroforma (EMSURE, Njemačka) (u digestoru). Uzorci su potom stavljeni na led 5-10 minuta pa centrifugirani na 14000 rpm 10 minuta. Iz uzorka je otpipetirano 750 μ L supernatanta u nove tubice te je dodano 75 μ L 3M NaOAc (pH 5.2). Nakon ručnog miješanja dodano je 700 μ L hladnog izopropanola (Sigma-Aldrich, SAD) nakon čega su tubice centrifugirane na 14000 rpm 25 minuta na 4 °C. Supernatant je odbačen, a talog plazmidne DNA ispran s 1 mL 70% EtOH (GramMol, Hrvatska) ručnim miješanjem te je potom centrifugiran na 14000 rpm 5 minuta. Cijeli supernatant je odbačen dok je pelet ostavljen u otvorenim ependorfovima 15 minuta u laminaru kako bi ostaci alkohola isparili. Nakon sušenja pelet je resuspendiran u 50 μ L vode bez nukleaza (Qiagen, Njemačka), a koncentracija izolirane plazmidne DNA izmjerena je pomoću NanoDrop spektrofotometra (BioSpec Nano, Shimadzu, Japan). Tako dobivena DNA pohranjena je na 4 °C do daljnje analize.

3.8. Detekcija gena koji kodiraju za ESBL i karbapenemaze pomoću metoda PCR-a i agarozne gel elektroforeze

Ispitivanje prisutnosti ESBL i karbapenemaznih gena provedeno je u deset PCR reakcija te analizom umnoženih PCR produkata gel elektroforezom. U osam reakcija su korištene početnice za

umnažanje pojedinačnog gena (tzv. „singleplex“), *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48}, a u druge dvije tzv. „multiplex“ reakcije su korištena tri para početnica za istovremeno umnažanje gena *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} i *bla*_{PER} odnosno gena *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} i *bla*_{SME}. Početnice korištene u ovom koraku proizvela je tvrtka Microsynth (Švicarska), a njihove sekvence nalaze se u Tablicama 2. i 3.

Tablica 2. Sekvence uzvodnih (F) i nizvodnih (R) početnica za umnažanje ESBL gena i veličine njihovih amplikona. Sekvence početnica preuzete su iz rada Jelić (2018.)

Gen	Sekvenca početnice (5'-3')	Veličina amplikona (bp)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F: GGTTAAAAAATCACTGCGTC R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	864 bp
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F: ATGATGACTCAGAGCATTTCG R: TGGGTTACGATTTTCGCCGC	866 bp
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F: ATGGTGACAAAGAGAGTGCA R: CCCTTCGGCGATGATTCTC	870 bp
<i>bla</i> _{TEM}	F: GCGGTAAGATCCTTGAGAGT R: TACGATACGGGAGGGCTTA	620 bp
<i>bla</i> _{SHV}	F: TTCGCCTGTGTATTATCTCC R: CGCCTCATTTCAGTTCCG	494 bp
<i>bla</i> _{PER}	F: CTGGGCTCCGATAATGA R: CTGGTCCGCATGATGA	349 bp
<i>bla</i> _{VEB}	F: ATGCCAGAATAGGAGTAGC R: AATTGTCCATTCGGTAAAGTAAT	673 bp
<i>bla</i> _{GES}	F: CTAGCATCGGGACACAT R: GACAGAGGCAACTAATTCG	504 bp
<i>bla</i> _{SME}	F: GCTCAGGTATGACATTAGGT R: CCAATCAGCAGGAACACTA	350 bp

F – forward (uzvodna početnica); R – reverse (nizvodna početnica)

Tablica 3. Sekvence uzvodnih (F) i nizvodnih (R) početnica za umnažanje gena za karbapenemaze i veličine njihovih amplikona. Sekvence početnica preuzete su iz rada Jelić (2018.)

Gen	Sekvenca početnice (5'-3')	Veličina amplikona (bp)
<i>Bla</i> _{KPC}	F: AGTTCTGCTGTCTTGTCT R: CTTGTCATCCTTGTTAGGC	793 bp
<i>bla</i> _{NDM}	F: ATGGAATTGCCCAATATTATGC R: TCAGCGCAGCTTGTCGG	813 bp
<i>bla</i> _{VIM}	F: GGTGAGTATCCGACAGTC R: CAGCACCRGGATAGAAGAG	442 bp
<i>bla</i> _{IMP}	F: GGYGTTTATGTTTCATACWTC R: GGATYGAGAATTAAGCCACTC	235 bp
<i>bla</i> _{OXA-48}	F: TTGGTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	744 bp

F – forward (uzvodna početnica); R – reverse (nizvodna početnica); nukleotidi (W – A ili T, Y – C ili T)

Reakcijska smjesa za ispitivanje prisutnosti gena *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* i *bla_{OXA-48}* pripremljena je miješanjem sastojaka navedenih u Tablici 4. Izolirana plazmidna DNA je prije dodavanja u reakcijsku smjesu razrijeđena u vodi bez nukleaza do koncentracije od 10 ng/μL. Korištene su dvije kontrole: pozitivna kontrola koju je činila plazmidna DNA iz bakterija pozitivnih na gen koji se analizira, a u negativnoj kontroli je DNA zamijenjena s vodom bez nukleaza. Reakcija umnažanja DNA provedena je na PCR uređaju (PCRmax Alpha Cycler 1 Thermal Cycler, Cole-Palmer, SAD) pod slijedećim uvjetima:

- Početna denaturacija DNA kalupa i aktivacija polimeraze – 94 °C, 2:30 min
- 30 ciklusa
 - Denaturacija DNA kalupa - 94 °C, 0:20 min
 - Sparivanje DNA kalupa s početnicama – 55 °C ili 57 °C*, 0:25 min
 - Sintetizacija komplementarnog DNA lanca - 72 °C, 0:45 min
- Završna elongacija – 72 °C, 2:00 min

*55 °C za umnažanje gena *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{VIM}* i *bla_{IMP}*, 57 °C za umnažanje gena *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* i *bla_{OXA-48}*

Tablica 4. Sastav PCR reakcijske smjese za umnažanje gena *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* i *bla_{OXA-48}*

Sastojak	Volumen
EmeraldAmpMix PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	7,5 μL
Uzvodna početnica	0,25 μL
Nizvodna početnica	0,25 μL
Voda bez nukleaza	4 μL
DNA	0,5 μL
Ukupni volumen	12,5 μL

Reakcijska smjesa s tri para početnica za istovremeno umnažanje gena *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* i *bla_{PER}* odnosno gena *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* i *bla_{SME}* pripremljena je miješanjem sastojaka navedenih u Tablici 5.

Tablica 5. Sastav „multiplex“ PCR reakcijske smjese za istovremeno umnažanje gena *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* i *bla_{PER}* odnosno gena *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* i *bla_{SME}*

Sastojak	Volumen
EmeraldAmpMix PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	7,5 μL
Početnica 1 (uzvodna + nizvodna)	0,25 μL + 0,25 μL
Početnica 2 (uzvodna + nizvodna)	0,25 μL + 0,25 μL
Početnica 3 (uzvodna + nizvodna)	0,25 μL + 0,25 μL

Voda bez nukleaza	3 μ L
DNA	0,5 μ L
Ukupni volumen	12,5 μ L

Uvjeti ovih PCR reakcija bili su slijedeći:

- Početna denaturacija DNA kalupa i aktivacija polimeraze – 94 °C, 2:30 min
- 35 ciklusa
 - Denaturacija DNA kalupa - 94 °C, 0:30 min
 - Sparivanje DNA kalupa s početnicama – 55 °C ili 58 °C*, 0:30 min
 - Sintetizacija komplementarnog DNA lanca - 72 °C, 0:45 min
- Završna elongacija – 72 °C, 2:00 min

*55 °C za umnažanje gena *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} i *bla*_{PER}; 58 °C za umnažanje gena *bla*_{VEB}, *bla*_{GES} i *bla*_{SME}

Umnoženi PCR produkti iz svih navedenih PCR reakcija detektirani su horizontalnom gel elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu kao što je opisano u poglavlju 3.4., s tim da je elektroforeza provedena na 100 V, 1h i korišten je DNA marker „GeneRuler 100 bp Plus“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Svi gelovi su promatrani na transiluminatoru pod UV svjetlom.

3.9. Određivanje skupine inkompatibilnosti plazmida metodom lančane reakcije polimerazom za identifikaciju replikona (PBRT)

Tipizacija plazmida provedena je koristeći PBRT metodu (eng. *PCR-based replicon typing*, PBRT) u kojoj su korištene početnice za 23 najučestalije skupine inkompatibilnosti (Inc) plazmida zabilježene u enterobakterija. Analiza Inc skupina F_{RepB}, K, B/O, ColE, ColE_{TP}, R, U, L/M provedena je u PCR reakcijskim smjesama s jednim parom početnica za odgovarajući gen, izuzev skupine L/M koja je dodatno analizirana i u multiplex reakciji s početnicama za umnažanje tri gena: *repA*, *traU* i *parA* (Poirel i sur., 2012.). Sekvence početnica i odgovarajućih amplikona prikazane su u Tablici 6. Sastav „singleplex“ PCR reakcijskih smjesa je isti kao u Tablici 4., a uvjeti PCR reakcija nalaze se u Tablici 7. Preostalih 15 Inc skupina analizirano je u pet „multiplex“ PCR reakcija s tri para početnica u svakoj reakciji (PCR reakcijska smjesa nalazi se u Tablici 5.) kako je navedeno u Tablici 6., a uvjeti PCR reakcija nalaze se u Tablici 7.

Tablica 6. Početnice korištene za određivanje skupine inkompatibilnosti plazmida pomoću PBRT metode

Replikon	Početnica	Slijed nukleotida početnice (5'-3')	Veličina amplikona (bp)	Ref.
HI1	HI1f	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	Carattoli i sur. (2005.)
	HI1r	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
HI2	HI2f	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	Carattoli i sur. (2005.)
	HI2r	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
II-ly	IIf	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	Carattoli i sur. (2005.)
	IIr	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
X	Xf	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	Carattoli i sur. (2005.)
	Xr	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
L/M	L/Mf	GGATGAAAACCTATCAGCATCTGAAG	785	Carattoli i sur. (2005.)
	L/Mr	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N	Nf	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	Carattoli i sur. (2005.)
	Nr	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
FIA	FIAf	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	Carattoli i sur. (2005.)
	FIAr	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
FIB	FIBf	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702	Carattoli i sur. (2005.)
	FIBr	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
W	Wf	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242	Carattoli i sur. (2005.)
	Wr	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
Y	Yf	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	Carattoli i sur. (2005.)
	Yr	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
P	Pf	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	Carattoli i sur. (2005.)
	Pr	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
FIC	FICf	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	Carattoli i sur. (2005.)
	FICr	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
A/C	A/Cf	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	Carattoli i sur. (2005.)
	A/Cr	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T	Tf	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	Carattoli i sur. (2005.)
	Tr	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
FIIs	FIIsf	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	Carattoli i sur. (2005.)
	FIIsr	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
F _{RepB}	FrepBf	TGATCGTTTAAGGAATTTG	270	Carattoli i sur. (2005.)
	FrepBr	GAAGATCAGTCACACCATCC		
K	K/Bf	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	Carattoli i sur. (2005.)
	Kr	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
B/O	K/Bf	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	159	Carattoli i sur. (2005.)
	K/Or	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		
ColE	oricolEf	GTTCGTGCATACAGTCCA	187	Garcia-Fernandez i sur. (2009.)
	oricolEr	GGCGAAACCCGACAGGACT		
ColE _{TP}	oricolEf	GTTCGTGCATACAGTCCA	106	Garcia-Fernandez i sur. (2009.)
	oricolETr	GGTTTACCGGTGTCATTCC		

R	IncRf	TCGCTTCATTTCCTTGCTTCAGC	251	Garcia-Fernandez i sur. (2009.)
	IncRr	GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA		
U	IncUf	TCACGACACAAGCGCAAGGG	843	Garcia-Fernandez i sur. (2009.)
	IncUr	TCATGGTACATCTGGGCGC		
L/M (OXA- 48)	RepA-A	GACATTGAGTCAGTAGAAGG	925	Poirel i sur. (2012.)
	RepA-B	CGTGCAGTTCGTCTTTCGGC		
	TraU-A	ATCTCACGCAATCTTACGTC	577	Poirel i sur. (2012.)
	TraU-B	TCGCGTCATGCGTGATCTTC		
	ParA-A	GCAGTGAAAACGTTGATCAG	532	Poirel i sur. (2012.)
	ParA-B	GATCGCAATGCGTCTTGGTG		

Ref. – referenca preuzetih sekvenci početnica te korištenog PCR programa

Tablica 7. Uvjeti PCR reakcija za identifikaciju replikona plazmida

Ref.	Carattoli i sur. (2005.)	Garcia-Fernandez i sur. (2009.)	Poirel i sur. (2012.)
Početna denaturacija DNA kalupa	94 °C / 5:00 min	94 °C / 5:00 min	94 °C / 2:30 min
Denaturacija DNA kalupa	94 °C / 1:00 min	94 °C / 1:00 min	94 °C / 0:25 min
Sparivanje DNA kalupa s početnicama	60 °C ^a / 0:30 min	55 °C ^b / 0:30 min	55 °C / 0:25 min
Sinteza komplementarnog DNA lanca	72 °C / 1:00 min	72 °C / 1:00 min	72 °C / 1:00 min
Završna elongacija	72 °C / 5:00 min	72 °C / 5:00 min	72 °C / 2:00 min

Ref. – referenca, ^a – 52 °C za F_{repB}, ^b – 62 °C za R i U

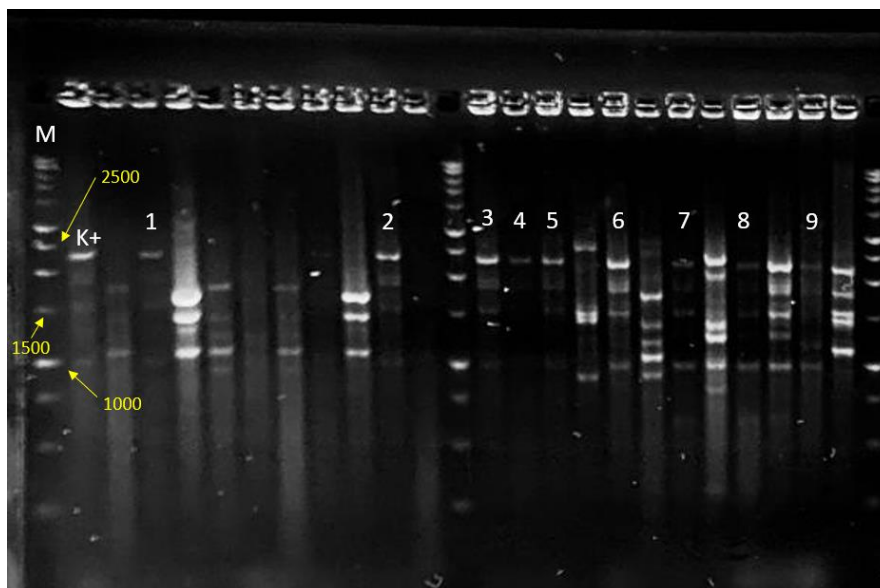
Umnoženi PCR produkti iz svih navedenih PCR reakcija detektirani su horizontalnom gel elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu kao što je opisano u Poglavlju 3.4., s tim da je elektroforeza provedena na 100 V, 1h i korišten je DNA marker „GeneRuler 100 bp Plus“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

4. Rezultati

4.1. Detekcija *E. coli* transkonjuganata s plazmidom koji nosi ESBL gen

Nakon provedbe BOX-PCR-a i agarozne gel elektroforeze, potvrđeno je da 18 od 76 potencijalnih transkonjuganata imaju isti *fingerprint* kao i pozitivna kontrola (jače vidljiva vrpca na 2400 bp, i tri slabije vidljive vrpce na 2000, 1500 i 1000 bp). Primjer agarozne gel elektroforeze BOX-PCR produkata prikazan je na Slici 9. Iz slike je vidljivo da BOX-PCR ampliconi u jažicama 1-9 imaju isti *fingerprint* kao i soj *E. coli* CV601 pa se smatraju pozitivnim transkonjugantima. Iz Tablice 8. je

vidljivo da su pozitivni transkonjuganti dobiveni iz pet od ukupno sedam analiziranih UPOV-a: Bjelovara, Karlovca, Vinkovaca, Varaždina i Zadra. Nasuprot tome, iz otpadnih voda UPOV-a Čakovca i Zagreba nisu dobiveni pozitivni transkonjuganti. Nadalje, iz izračunatog omjera koncentracija transkonjuganata i soja primatelja (učestalost transkonjugacije) utvrđeno je da se učestalost transkonjugacije kretala od oko 6×10^{-8} za uzorke otpadne vode KA i VŽ, oko 2×10^{-7} za VK i ZD do najviše 6.31×10^{-6} za BJ (Tablica 8.).



Slika 9. Agarozna gel elektroforeza s prikazom nekih rezultata BOX-PCR-a: M, marker (250 – 10000 bp); K+, pozitivna kontrola (*E. coli* CV601); brojevi 1-9 označavaju pozitivne transkonjugante s istim *fingerintom* kao i pozitivna kontrola (autorska fotografija)

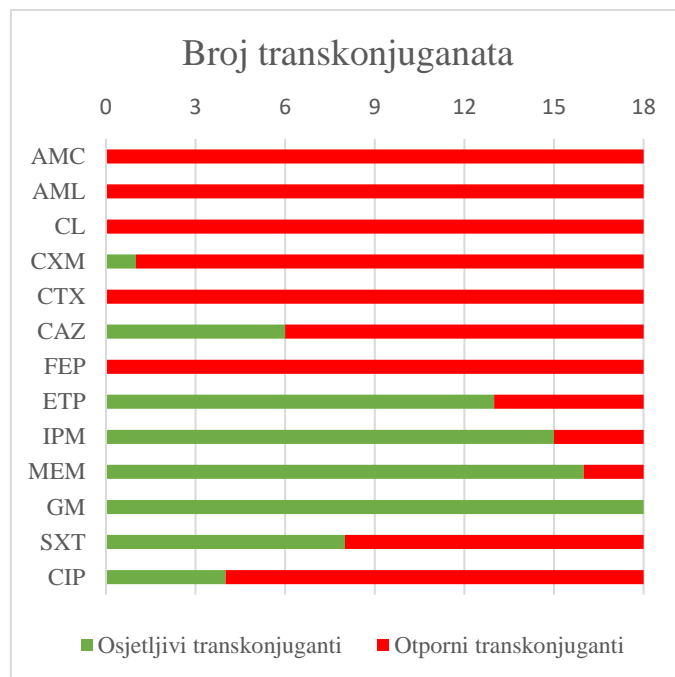
Tablica 8. Koncentracije soja bakterije primatelj *E. coli* CV601 i transkonjuganata te izračunata učestalost transkonjugacije za uzorke otpadnih voda iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda 7 hrvatskih gradova

Gradski uređaj za pročišćavanje otpadnih voda (Oznaka)	Koncentracija <i>E. coli</i> CV601 (CFU/mL)	Koncentracija transkonjuganata (CFU/mL)	Učestalost transkonjugacije
Bjelovar (BJ)	3.17×10^7	2×10^2	6.31×10^{-6}
Čakovec (ČK)	8.17×10^9	0	0
Karlovac (KA)	1×10^{10}	6×10^2	6×10^{-8}
Varaždin (VŽ)	3.89×10^9	2.67×10^2	6.86×10^{-8}
Vinkovci (VK)	4.5×10^9	9×10^2	2×10^{-7}
Zadar (ZD)	1.17×10^9	2×10^2	1.71×10^{-7}
Zagreb (ZG)	3.17×10^8	0	0

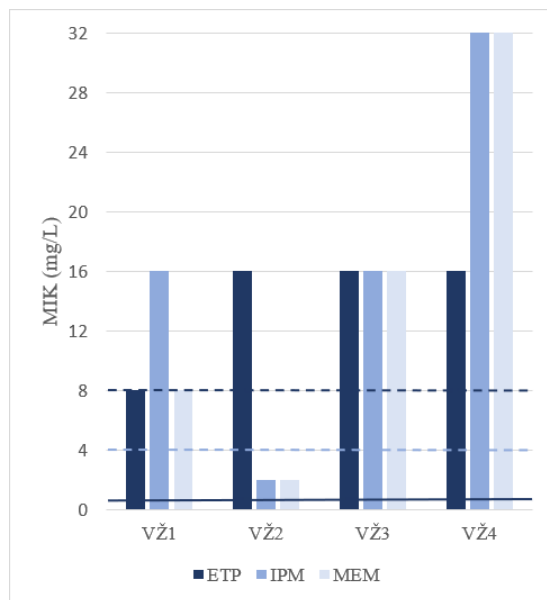
4.2. Ispitivanje osjetljivosti transkonjuganata na antibiotike

Pomoću metode disk difuzije, svim pozitivnim transkonjugantima je ispitana otpornost na 13 antibiotika iz 9 skupina. Osim toga, otpornost transkonjuganata na karbapeneme i COL je dodatno analizirana određivanjem MIK-a metodom mikrodilucije. Slika 10. prikazuje broj transkonjuganata osjetljivih i otpornih na 13 testiranih antibiotika primjenom disk difuzijskog testa. Svih 18 transkonjuganata je pokazalo otpornost na AMC, AML, CL, CTX i FEP, dok je većina njih bila otporna na CXM (n=17) i CAZ (n=12). Osim toga, većina transkonjuganata je pokazala otpornost na CIP (n=14) i SXT (n=10). Nasuprot tome, većina analiziranih transkonjuganata bila je osjetljiva na ETP (n=13), MEM (n=16) i IPM (n=15), a svi transkonjuganti bili su osjetljivi na GM.

Graf na Slici 11. prikazuje MIK vrijednosti ETP, MEM i IPM za 4 *E. coli* transkonjuganta koja su pokazala otpornost na karbapeneme u disk difuzijskom testu, a potječu iz otpadnih voda sa varaždinskog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Osim njih, metodom difuzijskog testa je VK5 pokazao otpornost na ETP, ali je naknadnim ispitivanjem metodom mikrodilucije bio osjetljiv na sva tri karbapenema. Prema vrijednostima MIK-a, sva četiri transkonjuganta varaždinskih otpadnih voda su otporna na ETP, jer su njihove vrijednosti ETP 8 ili 16 mg/L. Tri transkonjuganta (VŽ1, VŽ3 i VŽ4) su pokazala otpornost na IPM, jer su njihovi MIK-ovi > 4 mg/L, dok je MIK IPM-a za transkonjugant VŽ2 bio 2 mg/L pa se smatra da je on osjetljiv na IPM. Dva transkonjuganata imaju MIK MEM-a od 16 mg/L (VŽ3) odnosno 32 mg/L (VŽ4) te se oni smatraju otpornim na MEM, dok se preostala dva transkonjuganata (VŽ1 i VŽ2) s MIK-ovima ≤ 8 mg/L smatraju osjetljivima na MEM. Vrijedi napomenuti kako je svim transkonjugantima ispitana otpornost na COL te su svi smatrani osjetljivi s obzirom na to da je vrijednost MIK-a svih transkonjuganata < 1 mg/L.



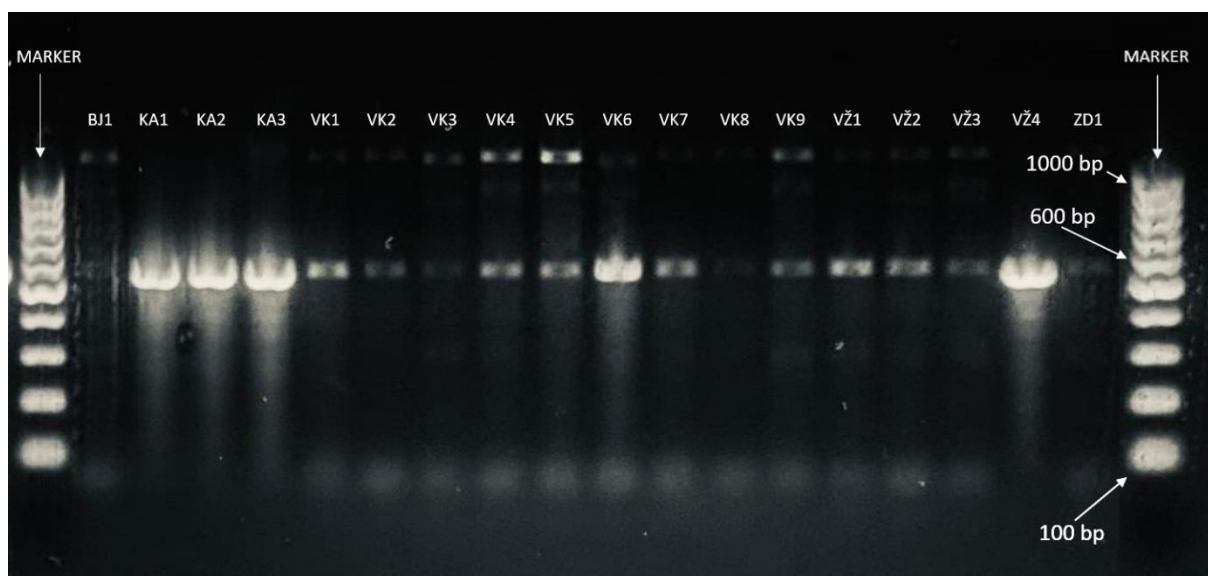
Slika 10. Prikaz broja transkonjuganata osjetljivih i otpornih na antibiotike primjenom disk difuzijskog testa. Antibiotici: AMC – amoksicilin, AML – amoksicilin/klavulanska kiselina, CL – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CTX – cefotaksim, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IMP – imipenem, MEM – meropenem, GM – gentamicin, SXT – trimetoprim/sulfometaksazol, CIP – ciprofloksacin



Slika 11. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za ertapenem (ETP), imipenem (IMI) i meropenem (MEM) za 4 transkonjuganata iz otpadne vode sa gradskog pročistača iz Varaždina. Puna tamno-plava linija na 0,5 mg/L prikazuje graničnu vrijednost osjetljivosti *E. coli* na ETP, isprekidana svijetlo-plava linija na 4 mg/L prikazuje graničnu vrijednost osjetljivosti *E. coli* na IMP, a isprekidana tamno-plava linija na 8 mg/L prikazuje graničnu vrijednost osjetljivost *E. coli* na MEM

4.3. Detekcija ESBL gena i gena za karbapenemaze na plazmidima

Nakon provedbe umnažanja DNA za 9 ESBL gena (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{SME}) i 5 gena koji kodiraju za karbapenemaze (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{OXA-48}) metodom PCR, produkti PCR reakcije su detektirani pomoću agarozne gel elektroforeze i vizualizirani na UV transiluminatoru. Primjer agarozne gel elektroforeze s produktima umnažanja DNA s početnicama za gene *bla*_{TEM}, *bla*_{PER} i *bla*_{SHV} prikazan je na Slici 12. U jažicama označenim s imenima transkonjuganata vidljiva je po jedna vrpca veličine otprilike 600 bp, što odgovara očekivanoj veličini amplicona za umnažanje gena *bla*_{TEM} koja iznosi 620 bp.



Slika 12. Agarozna gel elektroforeza DNA umnožene „multiplex“ PCR reakcijom s početnicama za gene *bla*_{TEM}, *bla*_{PER} i *bla*_{SHV}. Svi plazmidi iz transkonjuganata (BJ1-ZD1) su pozitivni na gen *bla*_{TEM} čija veličina amplicona iznosi 620 bp. Markeri su veličine od 100 – 1000 bp (autorska fotografija)

U Tablici 9. su prikazani rezultati molekularne detekcije svih ispitivanih ESBL i karbapenemaznih gena na plazmidima izoliranim iz pozitivnih transkonjuganata zajedno s njihovom fenotipskom otpornošću i tipizacijom plazmida. Svi transkonjuganti su ispoljavali otpornost na CTX, a njihovi plazmidi bili su pozitivni na ESBL gene *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{TEM}, dok je samo plazmid iz transkonjuganta porijeklom iz otpadne vode zadarskog pročistača (ZD1) bio dodatno pozitivan na gen *bla*_{GES}. Što se tiče gena za karbapenemaze, potvrđena su dva gena na ispitivanim mobilnim plazmidima: *bla*_{VIM} (n=4 plazmida) i *bla*_{NDM} (n=4 plazmida). Svi mobilni plazmidi porijeklom iz pročišćene otpadne vode varaždinskog UPOV-a (transkonjuganti VŽ1-VŽ4) bili su pozitivni na gen *bla*_{NDM}, a plazmid transkonjuganta VŽ4 je bio dodatno pozitivan i na gen *bla*_{VIM}. Osim na plazmidu iz transkonjuganta

VŽ4, gen *bla_{VIM}* je detektiran i na plazmidima porijeklom iz vinkovačke otpadne vode (VK6 i VK9) i bjelovarske otpadne vode (BJ1).

Tablica 9. Sumarni prikaz rezultata karakterizacije transkonjuganata s obzirom na prisutnost ESBL gena i gena za karbapenemaze te tipizaciju plazmida i fenotip otpornosti

Oznaka transkonjuganta*	ESBL geni	Geni za karbapenemaze	Skupine inkompatibilnosti	Fenotip otpornosti
BJ1	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP
KA1	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, ColE (ColE _{TP})	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP
KA2	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, ColE (ColE _{TP})	AMC, AML, CL, CXM, CTX, FEP
KA3	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, ColE (ColE _{TP})	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP
VK1	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, SXT, CIP
VK2	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, SXT, CIP
VK3	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, SXT, CIP
VK4	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, FEP, SXT, CIP
VK5	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CTX, FEP, SXT, CIP
VK6	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	L/M, N, ColE	AMC, AML, CL, CXM, CTX, FEP, ETP, SXT, CIP
VK7	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, SXT, CIP
VK8	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	/	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, FEP, SXT, CIP
VK9	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	L/M, N	AMC, AML, CL, CXM, CTX, FEP, SXT, CIP
VŽ1	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP, CIP
VŽ2	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP, IPM, CIP
VŽ3	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP, IPM, MEM, CIP
VŽ4	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{VIM}</i>	L/M, ColE	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, ETP, CIP

ZD1	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{TEM} , / <i>bla</i> _{GES}	L/M	AMC, AML, CL, CXM, CTX, CAZ, FEP, SXT, CIP
-----	--	-----	--

*Transkonjuganti su imenovani brojem pored kratice za grad u kojem se nalazi uređaj za

pročišćavanje otpadnih voda; / - nema pozitivnog rezultata na ispitivane gene, AMC – amoksisicilin, AML – amoksisicilin/klavulanska kiselina, CL – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CTX – cefotaksim, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ETP – ertapenem, IMP – imipenem, MEM – meropenem, SXT – trimetoprim/sulfometaksazol, CIP – ciprofloksacin

4.4. Klasifikacija plazmida prema skupinama inkompatibilnosti

Plazmidi iz svih 18 transkonjuganata analiziranih u ovom radu klasificirani su prema Inc skupinama pomoću PBRT metode. Kao što je vidljivo iz Tablice 9., za sve analizirane plazmide uspješno je utvrđena Inc skupina i pritom su detektirane tri različite skupine: L/M, N i ColE. Pritom treba napomenuti da je IncColE_{TP} podskupina IncColE skupine plazmida. Iz rezultata prikazanih u Tablici 9. također je vidljivo kako 12 od ukupno 18 transkonjuganata (KA1, KA2, KA3, VK1, VK2, VK3, VK4, VK5, VK7, VK8, VK9 i VŽ4) posjeduju dva plazmida (karlovački transkonjuganti i VŽ4 posjeduju IncL/M i IncColE; dok vinkovački transkonjuganti posjeduju IncL/M i IncN), 5/18 transkonjuganata (BJ1, VŽ1, VŽ2, VŽ3 i ZD1) je primilo jedan plazmid (IncL/M), a preostali transkonjugant (VK6) tri plazmida (IncL/M, IncN i IncColE). U svih 18 transkonjuganata detektirana je prisutnost plazmida koji pripadaju IncL/M skupini. Plazmidi iz transkonjuganata porijeklom iz otpadne vode uređaja u Karlovcu (KA1, KA2 i KA3) jedini spadaju u IncColE_{TP}, dok plazmidi iz transkonjuganata porijeklom iz otpadne vode uređaja u Vinkovcima (VK1, VK2, VK3, VK4, VK5, VK7, VK8 i VK9) jedini u IncN. IncColE skupina je potvrđena kod plazmida iz transkonjuganata porijeklom iz karlovačkih otpadnih voda (KA1, KA2 i KA3) te kod jednog transkonjuganta iz vinkovačkih (VK6) i varaždinskih (VŽ4) otpadnih voda. Ostale skupine inkompatibilnosti nisu detektirane.

5. Rasprava

Otpornost na 3GC posredovana ESBL enzimima veliki je javnozdravstveni problem širom svijeta. Bakterije koje proizvode ESBL su često višestruko otporne i predstavljaju veliki izazov u liječenju te je stoga nužno ograničiti njihovo širenje. Jedan od glavnih čimbenika koji dovodi do brzog širenja ESBL enzima je horizontalni prijenos njihovih gena između bakterija putem plazmida. Upravo se UPOV-i smatraju žarišnim mjestom za HGT i selekciju otpornih bakterija, ali dinamika širenja antibiotske otpornosti u njima još nije posve poznata. U ovom radu provedeno je istraživanje horizontalnog širenja otpornosti na 3GC između bakterija u otpadnim vodama nakon pročišćavanja u gradskim UPOV-ima. U tu svrhu primijenjena je metoda egzogene izolacije plazmida kojom se može

predočiti HGT koji se događa među bakterijama istih i/ili različitih vrsta u uzorku otpadne vode. Pritom je bakterija *E. coli* CV601 korištena kao primatelj plazmida s ESBL genom iz bakterija analizirane otpadne vode. Dobivenim *E. coli* transkonjugantima je potom analizirana osjetljivost na antibiotike fenotipskim metodama disk difuzije i mikrodilucije, a izdvojeni mobilni plazmidi su analizirani metodama PCR-a, PBRT-a i agarozne gel elektroforeze na prisutnost gena za ESBL i karbapenemaze te skupinu inkopatibilnosti.

Učestalost transkonjugacije opisuje koliko često će bakterija davatelj prenijeti plazmid s ESBL genom u bakteriju primatelj. Dobivene učestalosti transkonjugacije analiziranih plazmida u pet od sedam analiziranih gradskih UPOV u ovom istraživanju (10^{-6} - 10^{-8}) slične su onima u istraživanju Gekenidisa i suradnika (2020.) u kojem su autori pratili prijenos ESBL gena među bakterijama iz površinskih voda (rijeke i jezera) koje su se koristile za navodnjavanje poljoprivrednih površina. Nadalje, budući da analizirani UPOV-i ispuštaju pročišćene otpadne vode u rijeke, potvrđeni plazmidni prijenos otpornosti na 3GC među bakterijama u tim otpadnim vodama predstavlja potencijalnu prijetnju ekosustavu zbog širenja odgovarajućih ESBL gena na okolišne bakterije, uključujući patogene. To predstavlja potencijalni put infekcije ljudi i životinja koji su u doticaju s otpadnim vodama, npr. kupanjem u rijeci ili u jezeru u koje se ispušta pročišćena voda UPOV-a ili konzumacijom voća/povrća koje se prethodno zalijevalo tom pročišćenom otpadnom vodom (Hashem i Qi, 2021.).

Dobiveni rezultati fenotipske otpornosti transkonjuganata na peniciline i gotovo sve cefalosporine su očekivani, jer ESBL enzimi inaktiviraju te podskupine β -laktamskih antibiotika. Također, značajno je da je pored otpornosti na 3GC, veliki broj transkonjuganata pokazao otpornost na fluorokinolone (14/18 transkonjuganata) i kombinaciju sulfonamida i trimetoprima (8/18 transkonjuganata) što ukazuje na vezano nasljeđivanje gena otpornosti na ove skupine antibiotika i 3GC te posljedično, smanjeni terapijski izbor antibiotika dostupnih za liječenje. Kod svih transkonjuganata PCR analizom je dokazano prisustvo gena za ESBL CTX-M-1-tipa te gena za TEM-tip β -laktamaza. Literaturni podaci pokazuju da se oba gena *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{TEM} često zajedno nalaze na istom plazmidu i posljedično zajedno šire među bakterijama HGT-om (Hoang i sur., 2017.; Peerayeh i sur., 2016.). Budući da sekvencioniranje dobivenih PCR produkata nije izvedeno, ne može se utvrditi prisutnost specifičnih varijanti gena kao ni podatak da li potvrđeni TEM-tip enzima pripada skupini ESBL ili se radi o varijanti enzima odgovornoj za hidrolizu penicilina (npr. TEM-1 i TEM-2). Međutim, činjenica da je CTX-M-1-tip detektiran u svakom transkonjugantu se poklapa s rezultatima autora Fiolić i suradnika (2015.) koji su u svom nacionalnom istraživanju utvrdili da je u Hrvatskim bolnicama najčešći CTX-M-1-tip (varijanta CTX-M-15). Također, ranije je CTX-M-1-tip ESBL opisan kao dominantan CTX-M-tip u Europi (Livermoore i sur., 2007.), a kasnije i u svijetu (Bevan i sur., 2017.). Transkonjugant ZD1 je uz navedene gene za CTX-M-1-tip i TEM-tip β -laktamaza bio pozitivan i na *bla*_{GES}, manje zastupljeni klinički značajni ESBL gen koji se sporadično pojavljuje u Europi (Naas i sur., 2008.; Manageiro i sur., 2018.; Tiwari i sur., 2022.). Također, djelomična osjetljivost transkonjuganata

na CAZ može se objasniti prisutnošću ESBL gena *bla*_{CTX-M-15} (CTX-M-1 skupina) koji slabo hidrolizira CAZ u odnosu na CTX (Poirel i sur., 2002.a).

Nadalje, samo mali broj transkonjuganata (4/18), svi porijeklom iz varaždinskih otpadnih voda, pokazao je otpornost na karbapeneme, a na njihovim plazmidima je dokazana prisutnost gena za karbapenemaze, *bla*_{VIM} ili *bla*_{NDM}. Pritom je *bla*_{VIM} detektiran u transkonjugantima porijeklom iz otpadnih voda sa UPOV-a gradova KA, VK i VŽ, dok je *bla*_{NDM} detektiran samo u VŽ. To ukazuje na potencijalno veću rasprostranjenost i/ili mobilnost gena *bla*_{VIM}, što je u skladu s literaturom gdje se ovaj gen navodi kao više raširen (pogotovo u Europi) u usporedbi s *bla*_{NDM} koji je sporadično detektiran diljem svijeta, a regija Balkana (Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Kosova i Srbija) prepoznata kao njegov sekundarni rezervoar (Johnson i Woodford, 2013.; Matsumura i sur., 2017.). Prisutnost karbapenemaznih i ESBL gena na istom plazmidu predstavlja sve veći problem u kliničkoj praksi zbog smanjenog izbora antibiotika dostupnih za liječenje. Potrebno je također napomenuti da je u dva transkonjuganta (BJ1 i VK6) zabilježena prisutnost *bla*_{VIM} gena, ali nije potvrđena fenotipska otpornost na karbapeneme, što ukazuje na to da ovaj gen vjerojatno nije eksprimiran u *E. coli*. Nasuprot tome, u jednom transkonjugantu (VŽ4) zabilježeno je istovremeno prisustvo oba karbapenemazna gena, *bla*_{VIM} i *bla*_{NDM}. Očekivano, navedeni transkonjugant pokazao je više vrijednosti MIK-a za IPM i MEM u odnosu na ostale transkonjugante iz varaždinskih otpadnih voda (VŽ1, VŽ2 i VŽ3) koji su sadržavali jedan karbapenemazni gen (*bla*_{NDM}). Tim transkonjugantima (VŽ1, VŽ2 i VŽ3) su pak rasponi MIK vrijednosti za IPM (2-16 mg/L) i MEM (2-16 mg/L) manji od onih koje su Terbtthaukan i suradnici (2021.) detektirali za NDM u svom istraživanju za MIK_{IPM}=128 mg/L i MIK_{MEM}=128 mg/L.

Rezultati PBRT analize plazmida pokazali su prisutnost plazmida iz IncL/M skupine u svih 18 pozitivnih transkonjuganata. Ta plazmidna skupina predstavlja jednu od šest kliničkih najznačajnijih skupina, čiji konjugativni plazmidi imaju veliki potencijal širenja različitih gena za antibiotsku otpornost među enterobakterijama (Poirel i sur., 2012.). Svi IncL/M pozitivni transkonjuganti u ovom istraživanju imali su i ESBL CTX-M-1-tipa, što je u skladu s ranije opisanom vezom između plazmida IncL/M skupine i ESBL gena iz skupine *bla*_{CTX-M-1} (Carattoli, 2011.). Samo je 5 transkonjuganata posjedovalo isključivo L/M plazmid s genima za otpornost. To su BJ1 s genima *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} i *bla*_{VIM}, ZD1 s genima *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} i *bla*_{GES} te varaždinski transkonjuganti VŽ1, VŽ2 i VŽ3 s genima *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} i *bla*_{NDM}. Ovi rezultati potvrđuju i nadopunjuju ranije opise u kojima se ti geni, s izuzetkom *bla*_{GES}, dovode u vezi s plazmidima IncL/M skupine (Carattoli i sur., 2015.) Još jedna klinički značajna Inc skupina plazmida je IncN, koja je u ovom radu potvrđena kod svih transkonjuganata vinkovačkih otpadnih voda. Poznato je kako IncN plazmidi osim ESBL gena unutar CTX-M-1-tipa (Diestra i sur., 2009.), nose i gene za otpornost na druge skupine antibiotika kao što su to sulfonamidi i fluorokinoloni (Rozwandowicz i sur., 2018.). To je vjerojatan razlog otpornosti transkonjuganata VK1-VK9 na SXT i CIP. Osim IncL/M i IncN, u nekolicini transkonjuganata (KA1, KA2, KA3, VK6 i VŽ4) potvrđena je prisutnost plazmida IncColE skupine. To su mali plazmidi kojima je potreban drugi konjugativni

plazmid i njegov mehanizam za replikaciju kako bi se prenijeli u drugu bakteriju (Shintani i sur., 2015.; Rozwandowicz i sur., 2018.). S obzirom da je IncColE plazmid detektiran u ovom istraživanju zajedno sa plazmidima IncL/M te u jednom slučaju s IncL/M i IncN, to upućuje na mobilizaciju IncColE sa konjugativnim IncL/M ili IncN plazmidima. Nadalje, IncColE_{TP} je podskupina tih plazmida, detektirana kod svih karlovačkih transkonjuganata, koji su ispoljavali otpornost na CIP, što se poklapa sa rezultatima ranijeg istraživanja u kojemu je potvrđena prisutnost gena *qnrS1* za hidrolizu kinolona na IncColE_{TP} plazmidu (Gracia-Fernández i sur., 2008.).

U okviru ovog rada provedeno je istraživanje horizontalnog prijenosa gena za otpornost na 3GC između bakterija pročišćenih komunalnih otpadnih voda te karakterizacija plazmida na kojima se ti geni nalaze. Hrvatska se ubraja u zemlje s visokim stopama otpornosti kliničkih izolata na 3GC, posebice *K. pneumoniae*, (62% u 2021. god., ECDC, 2021.), pri čemu je ta otpornost pretežno uzrokovana proizvodnjom ESBL-ova (Tambić Andrašević i sur., 2021.). Zato je neophodno istražiti sve moguće izvore ovih enzima kako bi se obuzdalo njihovo daljnje širenje. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se u većini analiziranih uzoraka otpadnih voda otpornost na 3GC posredovana ESBL genima, poglavito onima iz skupine CTX-M-1, uspješno širi putem plazmida. Ono što zabrinjava jest činjenica da svi transkonjuganti sadrže plazmide koji pripadaju IncL/M skupini koju su nekad činili endemski plazmidi regije Mediterana, no zbog velikog potencijala širenja, u današnje vrijeme su globalno rasprostranjeni (Potter i sur., 2016). Budući da ovi plazmidi nose čitav spektar gena otpornosti, imaju potencijal da doprinesu razvoju višestruko otpornih sojeva, uključujući i sojeve s većim epidemiološkim potencijalom širenja.

6. Zaključci

Metodom egzogene izolacije plazmida potvrđen je plazmidni prijenos ESBL gena iz bakterija pročišćenih komunalnih otpadnih voda u *E. coli* CV601 primatelja za 5 od 7 UPOV-a (Bjelovar, Karlovac, Varaždin, Vinkovci i Zadar). Učestalost konjugacije kretala se od 10⁻⁶ do 10⁻⁸.

Metodom BOX-PCR-a je potvrđeno 18 pozitivnih transkonjuganata, kojima je pomoću metoda disk difuzije i mikrodilucije ustanovljen višestruko otporan fenotip tj. otpornost na ≥ 3 različite skupine antibiotika.

Molekularnim metodama PCR-a i gel elektroforeze utvrđena je prisutnost ESBL gena *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{TEM} na plazmidima u svih transkonjuganata te dodatno gen *bla*_{GES} u jednom transkonjugantu. Osim ESBL gena, potvrđena je prisutnost gena za karbapenemaze, *bla*_{NDM} i *bla*_{VIM}, svaki u četiri transkonjuganta.

PBRT metodom analizirani plazmidi su svrstani u tri skupine inkompatibilnosti: IncL/M, IncN i IncColE, pri čemu je u svim transkonjugantima detektiran plazmid IncL/M skupine, a drugi po učestalosti je IncN. IncColE je rjeđe detektiran.

Komunalne otpadne vode nakon pročišćavanja u UPOV-ima predstavljaju rizik za javno zdravlje, jer sadrže ESBL gene na mobilnim plazmidima koji se mogu prenijeti u širok spektar bakterijskih domaćina te tako proširiti rasprostranjenost ESBL gena u cijelom ekosustavu.

7. Literatura

- Adamski C. J., Cardenas A. M., Brown N. G., Horton L. B., Sankaran B., Venkataram Prasad B. V., Gilbert H. F., Palzkill T. (2014.) Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Biochemistry*. 54(2), 447-457
- Ahn C., Syed A., Hu F., O'Hara J. A., Rivera J. I., Doi Y. (2014.) Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 80(2), 154-158
- Ambler R. P. (1980.) The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 289, 321-331
- Arumugham V. B., Gujarathi R., Cascella M. (2022.) Third Generation Cephalosporins. StatPearls Publishing. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>, pristupljeno 1.5.2023.)
- Bevan E., Jones A. M., Hawkey P. M. (2017.) Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(2), 2145-2155
- Bonnet R. (2004.) Growing group of extended-spectrum.lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(1), 1-14
- Branger C., Ledda A., Billard-Pomares T., Doublet B., Fouteau S., Barbe V., Roche D., Ceuveiller S., Médigue C., Castellanos M., Decré D., Drieux-Rouze L., Clermont O., Glodt J., Tenaillon O., Cloeckart A., Arlet G., Denamur E. (2018.) Extended-spectrum β -lactamase-engoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microbial Genomics*. 4(9), e000203
- Bubonja-Šonje M., Abram M. (2014.) Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Medicina Flumensis*. 50(2), 128-149
- Bush K., Jacoby G. A. (2010.) Updated functional classification of β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54, 969-976
- Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T. M. (2008.) Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 14, 144-153
- Cantón R., Gonzáles-Alba J. M., Galán J. C. (2012.) CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 3(2), 110
- Carattoli A. (2011.) Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*. 301(8), 654-658

- Carattoli A. (2013.) Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6-7), 298-304
- Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K. L., Threlfall E. J. (2005.) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. 63(3), 219-228
- Carattoli A., Seiffert S. N., Shwendener S., Perreten V., Endimiani A. (2015.) Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE*. 10(5), e0123063
- Chanawong A., M'Zali F. H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P. M. (2001.) SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(6), 839-852
- Chaudhary U., Aggarwal R. (2004.) Extended spectrum β -lactamases (ESBL) – an emerging threat to clinical therapeutics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 22(2), 75-80
- D'Andrea M., Arena M., Rossolini G. M. (2013.) CTX-M type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *The International Journal of Medical Microbiology*. 303(6-7), 305-317
- De Rosa M., Verdino A., Soriente A., Marabotti A. (2021.) The odd couple(s): an overview of beta-lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(2), 617
- Decousser J. W., Poirel L., Nordmann P. (2001.) Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(12), 3595-3598
- Diestra K., Juan C., Curiao T., Moyá B., Miró E., Oteo J., Coque T. M., Pérez-Vázquez., Campos J., Cantón R., Oliver A., Navarro F. (2009.) Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding gene *sin* in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63(1), 60-66
- Draws S. M., Bonomo R. A. (2010.) Three decades of β -lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(1), 160-201
- Du Bois S. K., Marriott M. S., Amyes S. G. (1995.) TEM- and SHV- derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 35(1), 7-22
- Ellington M. J., Davies F., Jauneikaite E., Hopkins K. L., Turton J. F., Adams G., Pavlu J., Innes A. J., Eades C., Brannigan E. T., Findlay J., White L., Bolt F., Kadhani T., Chow Y., Patel B., Mookerjee S., Otter J. A., Sriskandan S., Woodford N., Holmes A. (2019.) A multi-species cluster of GES-5

carbapenemase producing *Enterobacterales* linked by a geographically disseminated plasmid. *Clinical Infectious Diseases*. 71(19), 2553-2560

European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC (2021.) Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) (https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net_AER_2021_final-rev.pdf, pristupljeno 23.8.2023.)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST (2023.) Clinical breakpoints – breakpoints and guidance. (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints, pristupljeno 5.2.2023.)

Fiočić Z., Bošnjak Z., Bedenić B., Budimir A., Mareković I., Cetković H., Kalenić S. (2015.) Nationwide survey of *Klebsiella pneumoniae* CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Croatia. *Collegium Antropologicum*.

García-Fernández A., Fortini D., Veldman K., Mevius D., Carattoli A. (2009.) Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63, 274-281

Gekenidis M.-T., Kläui A., Smalla K., Drissner D. (2020.) Transferable extended-spectrum β -lactamase (ESBL) plasmids in *Enterobacteriaceae* from irrigation water. *Microorganisms*. 8(7), 978

González-Plaza J. J., Blau K., Milaković M., Jurina T., Smalla K., Udiković-Kolić N. (2019.) Antibiotic-manufacturing sites are hot-spots for the release and spread of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in receiving aquatic environments. *Environment International*. 130(9), 104735

Guo J., Li J., Chen H., Bond P. L., Yuan Z. (2017.) Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Research*. 123(10), 468-478

Hashem M. S., Qi X. (2021.) Treated wastewater irrigation – a review. *Water*. 13(11), 1527

Hawkey P. M., Jones A. M. (2009.) The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64(dodatak 1), i3-i10

Hoang P. H., Awasthi S. P., Do Nguyen P., Nguyen N. L. H., Nguyen D. T. A., Le N. H., Van Dang C., Hinenoya A., Yamasaki S. (2017.) Antimicrobial resistance profiles and molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from healthy adults in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*. 79(3), 479-485

Huang Z. M., Mao P. H., Chen Y., Wu L., Wu J. (2004.) Study on the molecular epidemiology of SHV type β -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 25(5), 425-427

- Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., Philippon A. (2002.) Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(9), 3045-3049
- Jacoby G. A. (2009.) AmpC-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1), 161-182
- Jacoby G. A., Munoz-Price L. S. (2005.) The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*. 352(4), 380-391
- Jacoby G. A., Walsh K. E., Mills D. M., Walker V. J., Oh K., Robicsek A., Hooper D. C. (2006.) *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance- *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(4), 1178-1182
- Jelić M. (2018.) Mehanizmi rezistencije na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme (doktorski rad). Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb
- Jeon H. J., Lee H. J., Lee J. J., Park K. S., Karim A. M., Lee C.-R., Jeong B. C., Lee S. H. (2015.) Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(5), 9654-9692
- Johnson A. P., Woodford N. (2013.) Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) – mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 62(4), 499-513
- Jovcic B., Lepsanovic Z., Suljagic V., Rackov G., Begovic J., Topisirovic LJ., Kojic M. (2011.) Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(8), 3929-3931
- Karaiskos I., Giamarellou H. (2020.) Carbapenem-sparing strategies for ESBL producers: when and how. *Antibiotics*. 9(2), 61
- Karkman A., Do T. T., Walsh F., Virta M. P. J. (2018.) Antibiotic-resistance gene sin waste water. *Trend sin Microbiology*. 26(3), 220-228
- Khan A. U., Maryam L., Zarrilli R. (2017.) Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*. 17(1), 101
- Kumarasamy K. K., Toleman M. A., Wlsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C. G., Irfman S., Krishnan P., Kumar A. V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D. L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J. B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M. A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D. M., Woodford N. (2010.) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a meolecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 10(9), 597-602

- Li X. Z., Nikaido H. (2009.) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: and update. *Drugs*. 69(12), 1555-1623
- Lima L. M., Monteiro da Silva B. N., Barbosa G., Barreiro E. J. (2020.) β -Lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 208(12), 112829
- Livermore D. M., Woodford N. (2006.) The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*. 14(9), 413-420
- Livermore D. M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G. M., Arlet G., Ayala J., Coque T. M., Luzzaro F., Poirel L., Woodford N. (2007.) CTX-M: changing the face of ESBL in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(2), 165-174
- Low A. S., MacFrenzie F. M., Gould I. M. Booth I. R. (2001.) Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Molecular Microbiology*. 42(3), 619-630
- Malloy A. M. W., Campos J. M. (2011.) Extended-spectrum Beta-lactamases: A Brief Clinical Update. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 30(12), 1092-1093
- Malouin F., Bryan L. E. (1986.) Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30(1), 1-5
- Manageiro V., Romão R., Barata Moura I., Sampaio D. A., Vieira L., Ferreira E., Caniça M. (2018.) Molecular epidemiology and risk factors of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Portuguese hospitals: Result from European survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE). *Frontiers in Microbiology*. 9(11), 2834
- Manaia C. M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovides I. C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O. (2018.) Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. *Environment International*. 115(6), 312-324
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P. W., Prudhomme M. (1992.) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*. 20(13), 3479-3483
- Martínez-Martínez L., González-López J. J. (2014.) Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Micrología Clínica*. 32(12), 4-9
- Mathers A. J., Peirano G., Pitout J. D. (2015.) The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3), 565-591

- Matsumura Y., Peirano G., Devinney R., Bradford P. A., Motyl M. R., Adams M. D., Chen L., Kreiswirth B., Pitout J. D. D. (2017.) Fenomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(8), 2249-2258
- Metha D., Sharma A. K. (2016.) Cephalosporins: a review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*. 2016(1), 1-6
- Michael I., Rizzo L., McArdell C. S., Manaia C. M., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Fatta-Kassinos D. (2013.) Urban wastewater treatment plants as hotspots of the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research*. 47(3), 957-995
- Munck C., Albertsen M., Telke A., Ellabaan M., Nielsen P. H., Sommer M. O. A. (2015.) Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nature Communications*. 6, 8452
- Naas T., Poirel L., Nordmann P. (2008.) Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. 14 (suppl 1), 42-52
- Nicolau D. P. (2008.) Carbapenems: a potent class of antibiotics: Expert Opinion on Pharmacotherapy. 9(1), 23-37
- Nielsen H. L., Thomsen P. K., Litrup E., Torpdahl M., Overballe-Petersen S., Hansen F., Schultz Christensen A. K., Hasman H. (2021.) A case of *bla*NDM-1-positive *Salmonella* Kottbus, Denmark, November 2020. *Euro Surveill*. 26(26),pii=2100569
- Nikaido H. (2003.) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revised. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4), 593-656
- Nordmann P., Cuzon G., Naas T. (2009.) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*. 9(4), 228-236
- Nordmann P., Poirel L., Walsh T. R., Livermore D. M., (2011.) The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology*. 19(12), 588-595
- Nordmann P., Poirel L. (2014.) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 20(9), 821-830
- Novick R. P. (1987.) Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*. 51(4), 381-395
- Pagès J.-M., James C. E., Winterhalter M. (2008.) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6(12), 893-903
- Papp-Wallace K. M., Endimiani A., Taracila M. A., Bonomo R. A. (2011.) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(11), 4943-4960
- Partridge S. R. (2015.) Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology* 47(3), 276-284

- Patel G., Bonomo R. A. (2013.) „Stormy waters ahead“: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*. 4(3), 48
- Paterson D. L., Bonomo R. A. (2005.) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686
- Peerayeh S. N., Rostami E., Eslami M., Rezaee M. A. (2016.) High Frequency of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from male patients urine. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 11(2), e32696
- Petroni A., Corso A., Malano R., Cacace M. L., Bru A. M., Rossi A., Galas M. (2002.) Plasmidic extended-spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(5), 1462-1468
- Pitout J. D. D., Laupland K. B. (2008.) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*. 8(3), 159-199
- Pitout J. D. D., Peirano G., Kock M. M., Strydom K.-A., Matsumura Y. (2019.) The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*. 33(1), e00102
- Poirel L., Naas T., Guilbert M., Chaibi B., Labia R., Nordmann P. (1999.) Molecular and biochemical characterisation of WEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(3). 573-581
- Poirel L., Gniadkowski L. M., Nordmann P. (2002.a) Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50(6), 1031-1034
- Poirel L., Kampfer P., Nordmann P. (2002.b) Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(12), 4038-4040
- Poirel L., Lebessi E., Castro M., Fevre C., Foustoukou M., Nordmann P. (2004.) Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase SHV-5 producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(6), 2277-2279
- Poirel L., Naas T., Nordmann P. (2009.) Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(1), 24-38
- Poirel L., Bonnin R. A., Nordmann P. (2012.) Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(1), 559-562
- Poole K. (2007.) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*. 39(3), 162-176

- Potron A., Poirel L., Nordmann P. (2015.) Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 45(6) 568-585
- Puljko a., Milaković M., Križanović S., Kosić-Vukšić J., Babić I., Petrić I., Maravić A., Jelić M., Udiković-Kolić N. (2022.) Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant coliforms and gene sin wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia. *Journal of Hazardous Materials*. 427, 128155
- Queenan A. M., Bush K. (2007.) Carbapenemases: the versatile β -lactamase. *Clinical Microbiological Reviews*. 20(3), 440-458
- Robledo I. E., Aquino E., Vázquez G. J. (2011.) Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(6), 2968-2970
- Rozwandowicz M., Brouwer M. S. M., Fischer J., Wagenaar J. A., Gonzalez-Zorn B., Guerra B., Mevius D. J., Hordijk J. (2018.) Plasmids carrying antimicrobial resistance gene in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(5), 1121-1137
- Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J. A., Charlier P. (2008.) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(2), 234-258
- Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. (2020.) Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 8(1), 13
- Shintani M., Sanchez Z. K., Kimbara K. (2015.) Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*. 6(3), 242
- Sougakoff W., Goussard S., Gerbaund G., Courvalin P. (1988.) Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Reviews of Infectious Diseases*. 10(4), 879-884
- Tal Jasper R., Coyle J., Katz D. E., Marchaim D. (2015.) The complex epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Future Microbiology*. 10(5), 819-839
- Tambić Andrašević A., Žmak LJ., Obrovac M., Payerl Pal M., Debelec D., Bukovski S., Hunjak B., Babić-Erceg A., Unukić T., Mahovlić L., Pleško S., Herljević Z., Rezo Vranješ V., Jandrić M., Mareković I., Butić I., Pristaš I., Lucić S., Groš I. (2020.) Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020.g. *Akademija Medicinskih Znanosti Hrvatske*. Zagreb

- Terbtothakun P., Nwabor O. F., Siriyong T., Voravuthikunchai S. P., Chusri S. (2021.) Synergistic antibacterial effect of meropenem in combination with aminoglycosides against carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *bla*_{NDM-1} and *bla*_{NDM-5}. *Antibiotics*. 10(8), 1023
- Tiwari A., Paakkanen J., Österblad M., Kirveskari J., Hendriksen R. S., Heikinheimo A. (2022.) Wastewater surveillance detected carbapenemase enzymes in clinically relevant Gram-negative bacteria in Helsinki, Finland; 2011-2012. *Frontiers in Microbiology*. 13(6), 887888
- Van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. M. (2011.) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*. 2(9), 203
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L., Nordmann P. (2005.) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiological Reviews*. 18(2), 306-325
- Walther-Rasmussen J., Høiby N. (2007.) Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60(3), 470-482
- Weldhagen G. F., Poirel L., Nordmann P. (2003.) Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(8), 2385-2392
- World Health Organisation (2020.) Antibiotic resistance. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, pristupljeno 4.4.2023.)
- Yigit, H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K., Tenover F. C. (2001.) Novel carbapenem-hydrolyzing-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(4), 1151–1161
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. (2009.) Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(12), 5046-5054
- Zaatout N., Bouras S., Slimani N. (2021.) Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in wastewater: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Water and Health*. 19(5), 705-723

8. Životopis

Diplomski studij ekologija i zaštita prirode modul more sam upisao 2020. godine nakon stjecanja zvanja prvostupnika znanosti o moru na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Tijekom diplomskog studija sam se uključio u rad u Udruzi studenata biologije – BIUS, na početku kao član sekcije za leptire s kojom sam sudjelovao na raznim projektima npr. LepidopterISTRA 2021. u svrhu inventarizacije vrsta leptira na jugu Istre. Kasnije sam u Udruzi bio član Upravnog odbora na funkciji tajnika, za vrijeme mandata sam vodio financije Udruge, sudjelovao u realizaciji projekata te predstavljao Udrugu u javnosti. Što se studentskih poslova tiče, radio sam raznolike poslove, a najduže sam studentski radio kao laborant u tvornici boje Hempel d.o.o. u Umagu na kontroli kvalitete proizvoda.