

# NALAZ blaCTX-M GENA U IZOLATIMA BAKTERIJE ESCHERICHIA COLI IZDVOJENIH IZ FECESA KOKOŠI

---

Hadžić, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:420165>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

Lana Hadžić

**NALAZ *bla*<sub>CTX-M</sub> GENA U IZOLATIMA  
BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*  
IZDVOJENIH IZ FECESA KOKOŠI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Lana Hadžić

**DETECTION OF *bla*<sub>CTX-M</sub> GENES IN  
*ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM  
POULTRY FAECES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Lana Hadžić

**NALAZ *bla*<sub>CTX-M</sub> GENA U IZOLATIMA  
BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*  
IZDVOJENIH IZ FECESA KOKOŠI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Doc. dr. sc. Selma Pintarić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Lana Hadžić

**DETECTION OF *bla*<sub>CTX-M</sub> GENES IN  
*ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM  
POULTRY FAECES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Selma Pintarić, DVM, Assistant Professor

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, Lana Hadžić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

Zagreb, 2023.

## O MENTORICI

Doc. dr. sc. Selma Pintarić (rođena Mekić) rođena je u Zagrebu 17. listopada 1981. godine. Nakon završene Prve gimnazije u Zagrebu 2000. godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirala 2007. godine. Iste godine započinje vježbenički staž u Veterinarskoj stanici Jastrebarsko, a završava ga u Veterinarskoj ambulanti Plavi križ u Zagrebu godinu dana kasnije.

U rujnu 2008. godine zaposlena je na mjestu znanstvenog novaka na projektu „Mikoplazmoze i neke uvjetovane infektivne bolesti životinja“ voditeljice prof. dr. sc. Branke Šeol Martinec u Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Početkom 2009. godine upisala je doktorski studij iz veterinarskih znanosti u sklopu kojeg je izradila doktorsku disertaciju pod nazivom „Istraživanje mehanizama rezistencije na aminoglikozide i fluorokinolone u izolata bakterije *Pseudomonas aeruginosa* izdvojenih iz pasa“. Doktorirala je 2015. godine te je izabrana u zvanje više asistentice, a u znanstveno-nastavno zvanje docentice izabrana je 2018. godine.

Aktivno sudjeluje u izvedbi nastave integriranog preddiplomskog i diplomskog studija iz tri obvezna kolegija na hrvatskom jeziku te tri obvezna kolegija na engleskom jeziku. Mentorica je dva doktorska rada na doktorskom studiju iz veterinarskih znanosti. Sudjeluje u radu Bakteriološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Svoje znanje u provedbi dijagnostičkih postupaka stekla je na znanstveno-stručnim usavršavanjima u Hrvatskom veterinarskom institutu i Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb.

Autorica je više znanstvenih i stručnih radova te je sudjelovala u više izlaganja na međunarodnim i domaćim znanstveno-stručnim skupovima. Jedna je od prevoditelja udžbenika Sveučilišta u Zagrebu „Veterinarska imunologija, Načela i primjena“ koji se koristi u nastavi obveznog kolegija „Veterinarska imunologija“. Znanstvena djelatnost doc. dr. sc. Selme Pintarić vezana je uz bakteriologiju. Uže područje njezinog znanstvenog djelovanja obuhvaća istraživanje različitih uvjetno patogenih mikroorganizama i mehanizama rezistencije mikroorganizama na antimikrobne lijekove. Rezultati tih istraživanja značajno doprinose poznavanju osjetljivosti pojedinih bakterija na antimikrobne lijekove i pojavi rezistencije na području Republike Hrvatske s naglaskom na koncept „Jedno zdravlje“.

## **PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:**

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2022): Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from dogs with diarrhea. 4th International Conference of the European College of Veterinary Microbiology - Book of abstracts, 15-17 September, Bari, Italy, pp. 49-50.

TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2022): Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. from urine of dogs and cats in northwestern Croatia. Res. Vet. Sci. 151, 42-46.

PINTARIĆ, S., Z. ŠTRITOF, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2022): Resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. Proceedings of the conference Antimicrobial resistance in veterinary medicine: current state and perspectives, 21-23 June, Novi Sad, Serbia, pp. 128-140.

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Comparison of species-specific multiplex PCR and API 20 Strep for the identification of veterinary clinical *Enterococcus* isolates. Acta Microbiol. Imm. H. 68, 1; 124-124.

KAJMIĆ, A., A. JUTRIŠA, V. MOJČEC PERKO, J. HABUŠ, S. HAĐINA, S. PINTARIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): High carriage rate of methicillin-resistant staphylococci in small animal veterinary clinicians – indirect evidence of zoonotic transmission. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Croatia, pp. 46-46.

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, D. BROZIĆ, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog feces. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Croatia, pp. 45-45.



TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Incidence of infections caused by *Enterococcus* spp. in animals. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Croatia, pp. 55-55.

HADŽIĆ, L., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2021): Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 29, 3; 28-36.

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from clinical samples of cats and dogs. 2nd International Conference on "Theme: Recent Advancements in Treatment, Control and Elimination of Infectious Diseases, 05-06 March, Washington, SAD, pp. 30-30.

ŠTRITOF, Z., R. MATIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, S. PINTARIĆ, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ (2021): Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with respiratory disease. FEMS Online Conference on Microbiology: Electronic Abstract Book, 28-31 October, Beograd, Serbia, pp. 5-5.

BRUKETA, T., T. AUGUSTIN, S. PINTARIĆ, B. ŠEOL MARTINEC; I. DOBRIĆ, B. BAKOTA (2019): Pilot Study: Internally Cooled Ortopedic Drills - Standard Sterilization is not Enough?. Acta Clin. Croat. 58, 2, 379-385.

GALOVIĆ, M., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2019): Mikoplazme pasa. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 27, 7-8, 64-72.

GALOVIĆ, MIHAEL (2018): Mikoplazme pasa. Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

PINTARIĆ, S., B. ŠEOL MARTINEC (2018): Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. Veterinarska stanica. 49, 2, 105-116.

PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from

dogs. 7th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 5-7 October, Zagreb, Croatia, pp. 56-56.

PINTARIĆ, S., K. MATANOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Fluoroquinolone susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs - comparing disk diffusion and microdilution methods. Vet. Arhiv. 87, 3; 291-300.

## ZAHVALA

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Šeol Martinec uz čiju podršku sam započela ovo istraživanje.

Najveću zahvalu dugujem mentorici doc. dr. sc. Selmi Pintarić na pomoći pri istraživanju i radu u laboratoriju, a posebno na trudu i velikom razumijevanju tijekom ovog dugog perioda punog izazovnih trenutaka. Svojim stručnim vodstvom i usmjeravanjem pomogla mi je da ovaj rad uspješno privedem kraju na čemu ću joj uvijek biti zahvalna.

Hvala i mojim kolegama iz J.U. „Veterinarski Zavod Bihać“ te svima iz bakteriološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na čelu s voditeljicom izv. prof. dr. sc. Zrinkom Štritof. Također zahvaljujem dr. sc. Andrei Tumpi na pomoći tijekom laboratorijskog rada i dr. sc. Vesni Mojčec Perko u provođenju i tumačenju molekularnog dijela istraživanja.

Hvala mojoj Lenki koja je kao i uvijek vjerovala u mene i bila moja najveća podrška, i mome Miri na beskrajnom strpljenju i velikoj tehničkoj pomoći pri izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su bili moj vjetar u leđa svih ovih godina.

Ovaj rad posvećujem svom ocu koji me je cijeli život poticao na učenje, ohrabrivao i podržavao kako na životnom, tako i na profesionalnom putu.

# SAŽETAK

## NALAZ *bla*<sub>CTX-M</sub> GENA U IZOLATIMA BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI* IZDVOJENIH IZ FECESA KOKOŠI

Za ovo istraživanje prikupljeno je 498 uzoraka fecesa kokoši s različitih peradarskih farmi Bosne i Hercegovine. Nacijepljivanjem na podloge s dodatkom 1 mg/l cefotaksima izdvojeno je ukupno 280 izolata bakterijske vrste *Escherichia coli* rezistentnih na cefotaksim.

Postupkom kombiniranih diskova u 74 izolata je fenotipski utvrđena tvorba beta-laktamaza proširenog spektra i oni su uključeni u daljnje istraživanje. Disk difuzijskim postupkom ispitana je njihova osjetljivost na slijedećih 12 antimikrobnih lijekova: amoksicilin/klavulanska kiselina, cefoksitin, cefotaksim, ceftazidim, cefpodoksim, cefepim, meropenem, enrofloksacin, ciprofloksacin, gentamicin, sulfametaksazol/trimetoprim i tetraciklin. Osim na cefotaksim, svi izolati bili su rezistentni na cefpodoksim, a rezistencija na ostale cefalosporine je bila statistički značajno niža. Na ceftazidim je bilo 54,1 %, na cefepim 50,0 % i na cefoksitin 48,6 % rezistentnih izolata. Najveći broj izolata bio je rezistentan na amoksicilin s klavulanskom kiselinom (78,4 %), potom na tetraciklin (51,4 %). U osjetljivosti izolata na fluorokinolone nije bilo statistički značajne razlike, njih 32,4 % je bilo rezistentno na enrofloksacin, a 28,4 % na ciprofloksacin. Na sulfametaksazol/trimetoprim je bilo 18,9 %, a na gentamicin 6,8 % rezistentnih izolata. Na meropenem nije bilo rezistencije. Šezdeset tri izolata (85,1%) bila su rezistentna ili umjereno osjetljiva na tri ili više antimikrobnih lijekova iz različitih kategorija prema čemu su procijenjeni kao multirezistentni izolati.

Kod 74 izolata lančanom reakcijom polimerazom ispitana je prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>. U 54 izolata (73,0 %) dokazana je prisutnost jednog ili više gena. Gen *bla*<sub>CTX-M</sub> je dokazan u 33 izolata (61,1 %), gen *bla*<sub>TEM</sub> u 33 izolata (61,1 %) i gen *bla*<sub>SHV</sub> u jednom izolatu (1,9 %). Kod 13 izolata (24,1 %) dokazana je istovremena prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>. Niti u jednom izolatu nije dokazana istovremena prisutnost sva tri gena (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>). Molekularna tipizacija gena *bla*<sub>CTX-M</sub> pokazala je da 32 od 33 izolata (97,0 %) posjeduje gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, a jedan od 33 izolata (3,0 %) posjeduje gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

**Ključne riječi:** *Escherichia coli*, feces, kokoš, rezistencija, ESBL, *bla*<sub>CTX-M</sub>

# EXTENDED ABSTRACT

## DETECTION OF *bla*<sub>CTX-M</sub> GENES IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM POULTRY FAECES

**Introduction:** *Escherichia coli* (*E. coli*) is a Gram-negative, rod-shaped bacterium found in the gastrointestinal tract of warm-blooded animals and humans as part of the normal gut microbiota, but is also one of the most common causes of bacterial infections in humans and animals. *E. coli* strains can be classified into two groups: commensal strains and pathogenic strains that cause intestinal and extraintestinal infections in healthy individuals. In contrast to commensal strains, intestinal pathogenic *E. coli* strains are rarely found in the normal intestinal microbiota of healthy hosts. They appear to be essentially obligate pathogens that cause gastroenteritis or colitis when ingested in sufficient amounts. Six pathotypes of intestinal pathogenic *E. coli* strains are recognized: enteropathogenic (EPEC), enterohemorrhagic (EHEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), and diffusely adherent (DAEC). Extraintestinal strains of *E. coli* (ExPEC) are usually found in the normal gut microbiota as commensals but can cause various infections. These include uropathogenic *E. coli* (UPEC) isolated from humans and animals with urinary tract infections, neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC) isolated from human neonates, septicemia associated *E. coli* (SePEC), and also avian pathogenic *E. coli* (APEC) responsible for colibacillosis in poultry.

*E. coli* is excreted with faeces and can survive for weeks or months in faecal particles, dust and water, and enter the environment via faeces and wastewater treatment plants. Pathogenic strains of *E. coli* can be transmitted from animals to humans through the food chain and pose a direct threat to both the poultry industry and human health as they can lead to difficult-to-treat infections. For the treatment of infections caused by *E. coli*, the most commonly used classes of antimicrobials include beta-lactam antibiotics, fluoroquinolones, aminoglycosides, sulfonamides, tetracyclines, and nitrofurantoin. Beta-lactam antimicrobials are among the clinically most important antimicrobials used to treat bacterial infections in both human and veterinary medicine. Because of their broad spectrum and low toxicity, they are currently the most widely used class of antimicrobial agents to treat infections caused by *E. coli*

strains. However, the widespread and often inappropriate use of antimicrobials has led to the emergence of resistant bacterial isolates.

The predominant mechanism of beta-lactam resistance in *E. coli* is the production of beta-lactamases, which inactivate antibiotics by hydrolyzing the beta-lactam ring. To date, many different beta-lactamases have been identified, with extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) being the most important. ESBLs are enzymes that can hydrolyze penicillins, cephalosporins, and monobactams, but not cephamycins or carbapenems, and are inhibited by beta-lactamase inhibitors such as clavulanic acid. There are three major ESBL families: TEM, SHV, and CTX-M. The predominant and clinically most important ESBLs belong to the CTX-M family, followed by the TEM and SHV families, which are found worldwide. The original ESBL enzymes were variants of TEM and SHV variants that had amino acid substitutions that resulted in a change in their substrate profile to include the extended-spectrum cephalosporins. CTX-M enzymes originated from the *Kluyveraa ascorbata* chromosomal AmpC enzyme. Most variants can be classified into five groups based on sequence homologies: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25.

ESBLs are often encoded by genes located on plasmids, allowing them to spread among bacteria, and they also carry genes for resistance to other classes of antimicrobial agents, causing bacterial strains to become multidrug-resistant (MDR). Multidrug-resistant bacterial strains are resistant to at least one agent from three or more antimicrobial drug classes. Such strains of bacteria are of great public health concern, since multidrug-resistant bacterial infections are difficult to treat as there are few or no treatment options.

Antimicrobial resistance has become a rapidly growing public health concern worldwide and for this reason the World Health Organization (WHO) included antimicrobial resistance as one of the top ten global health threats in 2019. The global distribution of ESBL-positive isolates is of great concern as these isolates are found in increasing numbers in livestock, including poultry, retail meat and pets. The presence of ESBL-producing *E. coli* in food animal production systems is of public health concern as it can be transmitted to humans through the food chain. Also, the presence of ESBL-positive isolates in companion animals can pose a potential public health risk, as animals can serve as reservoirs of resistant bacteria for humans.

Because of the limited therapeutic options and the risks associated with the acquisition of new resistance mechanisms, ESBL-producing strains pose a major challenge for microbiologists and clinical therapists. Therefore, laboratory detection of resistant strains prior to the use of an antimicrobial agent in human and veterinary medicine is of great importance. In addition, continuous education on the rational use of antibiotics is necessary to prevent the spread of resistant and multidrug-resistant bacteria.

Today, the prevalence of food-producing animals carrying *E. coli* producing CTX-M type ESBL has reached worryingly high levels. Food safety and the fight against antibiotic resistance are particularly relevant in the One Health approach. Keeping this problem under control requires constant monitoring of the evolution of the ESBL situation and the application of an interdisciplinary One Health approach.

The aim of this study is to phenotypically confirm the presence of ESBL production in *E. coli* isolates using combined disk diffusion method containing cefotaxime and ceftazidime with and without clavulanic acid. A further aim is to detect the presence of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene and to investigate the presence of the *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes in *E. coli* isolates. Also to identify *bla*<sub>CTX-M</sub> genes for CTX-M- positive isolates.

**Material and methods:** In 2016 and 2017, a total of 498 faecal samples were collected from different poultry farms in Bosnia and Herzegovina. Samples were cultured on MacConkey agar supplemented with 1 mg/l cefotaxime after pre-enrichment with Tryptic Soy Broth containing 1 mg/l cefotaxime. In this way, the selection of cefotaxime resistant isolates was carried out.

The identification of *E. coli* was performed according to the procedure described by Markey et al. (2013). All cefotaxime-resistant isolates were identified by standard bacteriological culture and confirmed by several biochemical tests. *E. coli* colonies on MacConkey agar are light pink, indicating acid production due to fermentation of lactose. Colonies were identified biochemically as indole positive and oxidase negative using indole and oxidase utilization assays.

After routine bacteriological analysis, all cefotaxime-resistant *E. coli* isolates were screened for ESBL production using a combined disk diffusion method using cefotaxime and

ceftazidime disc with and without clavulanate. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was included in the study as an ESBL positive control strain and *E. coli* ATCC 25922 as an ESBL negative control strain. The diameters of the zones of inhibition were interpreted according to the criteria recommended in the Clinical and Laboratory Standards Institute document (CLSI, 2018). An increased zone size in the presence of clavulanate of five millimeters or more was considered indicative of ESBL production. All isolates that were phenotypically positive for ESBL production were included in further studies.

Identification of the isolates was performed using the API 20 E identification system.

Antimicrobial susceptibility was determined using the standard disk diffusion method for 12 antimicrobials: amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefpodoxime, cefepime, meropenem, enrofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline. Inhibition zone diameters were interpreted according to the criteria recommended in the documents of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; CLSI, 2018).

All isolates phenotypically confirmed to be ESBL-producing *E. coli* were subjected to molecular analysis using multiplex PCR screening to detect *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* genes. Additional PCR was performed for *bla<sub>CTX-M</sub>* positive isolates with primers amplifying a 948 bp PCR gene fragment for sequencing. PCR products were sequenced by Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands and the results were analyzed using the Basic Local Alignments Tool (BLAST).

For statistical analysis STATISTICA v.14.0. (Statistica, Tibco, 2020.) program was used. Fisher's exact test was used to compare statistically significant differences in the presence of individual genes, including statistically significant differences in susceptibility among isolates to antimicrobials from the same class.

**Results:** A total of 498 faecal samples were collected from several different poultry farms in Bosnia and Herzegovina. A total of 280 cefotaxime-resistant *E. coli* isolates (56.2%) were isolated. The prevalence of phenotypically confirmed ESBL-producing *E. coli* isolates in poultry faeces was 14.9%. Based on the disk diffusion assay, all tested isolates showed resistance to cefpodoxime (100.0%) in addition to resistance to cefotaxime. The highest



resistance was observed to amoxicillin-clavulanic acid (78.4%), followed by ceftazidime (54.1%). Resistance to tetracycline was 51.4%, followed by cefepime (50.0%) and cefoxitin (48.6%). Resistance to enrofloxacin was 32.4% and to ciprofloxacin 28.4%. The lowest resistance was observed to trimethoprim-sulfamethoxazole (18.9%) and there were only 6.8% of isolates resistant to gentamicin. All isolates tested were susceptible to meropenem (100.0%). Multidrug resistance was found in 85.1% of the isolates. Isolates were significantly more resistant to cefotaxime and cefpodoxime (Fisher's exact test,  $p < 0,05$ ). There was no statistically significant difference between fluoroquinolones.

Among 74 phenotypically confirmed ESBL-producing *E. coli* isolates, 54 isolates (73.0%) were positive for tested ESBL genes. Among them, 33 isolates (61.1%) carried the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, 33 (61.1%) carried the *bla*<sub>TEM</sub> gene and only one isolate was positive for the *bla*<sub>SHV</sub> gene (1.9%). The coexistence of *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes within the same isolate was detected in 13 (24.1%) isolates, while none of the isolates tested showed the coexistence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes. Sequence analysis of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene revealed that 32 (97.0%) of the isolates carried the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene and only one isolate (3.0%) carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene. Of 74 isolates analyzed, 20 (27.0%) isolates had no ESBL genes.

**Conclusions:** The concentration of 1 mg/l cefotaxime as a selective antimicrobial agent is low for the selection of ESBL-producing *E. coli* isolates.

Of 498 poultry faecal samples, 54 of the *E. coli* isolates (10.8%) were positive for ESBL genes tested. These isolates can be the source of resistance genes and pose a public health threat.

In this study, the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was the most prevalent, found in 32 out of 33 isolates (97.0%). This result suggests that isolates from poultry are not involved in human infections in Bosnia and Herzegovina, since among human isolates the most common gene variant is *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

Of 74 isolates analyzed, 63 (85.1%) were found to be multidrug resistant, likely as a result of the widespread and inappropriate use of antimicrobials in the poultry industry.

**Key words:** *Escherichia coli*, faeces, poultry, resistance, ESBL, *bla*<sub>CTX-M</sub>

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE.....	5
2.1. Bakterijska vrsta <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.1. Morfološke, uzgojne i biokemijske osobine vrste <i>E. coli</i> .....	7
2.1.2. Identifikacija vrste <i>E. coli</i> .....	7
2.1.3. Antigenske osobine vrste <i>E. coli</i> .....	8
2.2. Osjetljivost bakterijske vrste <i>E. coli</i> na antimikrobne lijekove .....	9
2.2.1. Mehanizmi rezistencije na beta-laktamske antimikrobne lijekove .....	9
2.3. Beta-laktamaze .....	10
2.3.1. Genetsko porijeklo beta-laktamaza.....	11
2.3.2. Povijesni pregled pojave beta-laktamaza.....	11
2.3.3. Podjela beta-laktamaza .....	13
2.3.3.1. Funkcionalna podjela beta-laktamaza.....	13
2.3.3.2. Molekularna podjela beta-laktamaza .....	18
2.4. Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) .....	19
2.4.1. TEM beta-laktamaze proširenog spektra .....	19
2.4.2. SHV beta-laktamaze proširenog spektra.....	20
2.4.3. CTX-M beta-laktamaze proširenog spektra.....	20
2.4.3.1. CTX-M beta-laktamaze u humanoj medicini .....	21
2.4.3.2. CTX-M beta-laktamaze u veterinarskoj medicini.....	22
2.4.4. OXA beta-laktamaze.....	23
2.4.5. Ostale ESBL.....	23
2.4.6. AmpC beta-laktamaze.....	24
2.4.7. Beta-laktamaze otporne na inhibitore beta-laktamaza .....	25
2.5. Laboratorijska dijagnostika ESBL.....	26
2.5.1. Postupci fenotipske potvrde tvorbe ESBL.....	26
2.5.1.1. Postupak kombiniranih diskova .....	26
2.5.1.2. Dvostruki disk-sinerijski test .....	27
2.5.2. Postupci molekularne potvrde tvorbe ESBL.....	27
3. OBRAZLOŽENJE TEME .....	28
4. MATERIJAL I METODE.....	32
4.1. Uzorci .....	33

4.2. Probir izolata rezistentnih na cefotaksim.....	33
4.3. Odabir izolata <i>E. coli</i> rezistentnih na cefotaksim.....	33
4.3.1. Rast i razgradnja laktoze na MacConkeyevom agaru.....	33
4.3.2. Određivanje sposobnosti tvorbe indola.....	34
4.3.3. Određivanje sposobnosti tvorbe oksidaze.....	34
4.4. Fenotipska potvrda tvorbe ESBL.....	35
4.5. Biokemijska identifikacija vrste pomoću API 20E niza.....	35
4.6. Određivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom.....	36
4.7. Dokazivanje gena za ESBL lančanom reakcijom polimerazom.....	39
4.7.1. Izdvajanje bakterijske DNA.....	39
4.7.2. Dokazivanje gena <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> i <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	40
4.8. Određivanje varijante CTX-M beta-laktamaze.....	42
4.8.1. Pročišćavanje proizvoda lančane reakcije polimerazom.....	43
4.8.2. Molekularna tipizacija gena <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	45
4.9. Statistička obrada podataka.....	45
5. REZULTATI.....	47
5.1. Porijeklo, uzgojne, morfološke i biokemijske osobine izolata.....	48
5.2. Rezultati fenotipske potvrde tvorbe ESBL.....	49
5.3. Rezultati biokemijske identifikacije vrste pomoću API 20E niza.....	50
5.4. Rezultati određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom.....	52
5.5. Rezultati dokazivanja gena <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> i <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	53
5.6. Rezultati molekularne tipizacije gena <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	54
6. RASPRAVA.....	59
7. ZAKLJUČCI.....	68
8. LITERATURA.....	70
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	81

## **1. UVOD**

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) je gram-negativna štapićasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* koja čini značajan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, no istovremeno je i jedan od najčešćih uzročnika različitih infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini. Sojevi bakterije *E. coli* mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine komenzali koji, kao dio crijevne mikrobiote, za zdrav organizam nisu štetni. Drugu skupinu čine patogeni sojevi koji uzrokuju crijevne i izvancrijevne infekcije u zdravih jedinki.

Obzirom na urođenu osjetljivost *E. coli* na brojne antimikrobne lijekove, u liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom mogu se primjenjivati beta-laktamski antibiotici, fluorokinoloni, aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini i nitrofurantoin. Međutim, prekomjerna, nepotrebna i često neodgovarajuća upotreba antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Stečena rezistencija enterobakterija može biti posljedica mutacija već postojećih gena ili stjecanja novog genetskog materijala što će dovesti do promjene ciljnog mjesta vezanja lijeka, proizvodnje enzima koji inaktiviraju lijek, pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice i/ili smanjene propusnosti stanične stijenke za prolaz antimikrobnog lijeka.

Stečena rezistencija *E. coli* na beta-laktamske antimikrobne lijekove od osobitog je značaja jer se ova skupina lijekova, zbog širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti, najčešće primjenjuje u liječenju. Najčešći mehanizam stečene rezistencije na beta-laktame je tvorba enzima beta-laktamaza koji, razgrađujući beta-laktamski prsten, čine antibiotik nedjelotvornim. Opisane su brojne vrste beta-laktamaza, a osobit značaj imaju beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL, engl. *extended spectrum  $\beta$ -lactamase*). To su enzimi koji razgrađuju peniciline, cefalosporine i monobaktame, ali ne razgrađuju cefamicine i karbapeneme i osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza, kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam.

Beta-laktamaze mogu biti kromosomske, odnosno kodirane genima smještenim na bakterijskom kromosomu, ili plazmidne koje su kodirane genima smještenim na pokretnim genskim elementima kao što su plazmidi i transpozoni. Rezistencija uzrokovana plazmidnim beta-laktamazama prenosiva je iz jedne bakterijske stanice u drugu i za razliku od kromosomskih beta-laktamaza nije specifična za vrstu, pa se može širiti među različitim bakterijskim vrstama i rodovima.

Većina beta-laktamaza proširenog spektra pripada jednoj od tri osnovne skupine: TEM, SHV i CTX-M. TEM i SHV beta-laktamaze proširenog spektra nastale su iz TEM-1, TEM-2 i SHV-1 beta-laktamaza točkastim mutacijama u *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> genima što je uzrokovalo širi spektar djelovanja navedenih enzima. CTX-M beta-laktamaze nisu nastale mutacijama gena za beta-laktamaze nego su kodirane plazmidnim genima koji potječu od kromosomskih gena bakterijskih vrsta *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana*, te su danas dominantne beta-laktamaze proširenog spektra u izolatima kako humanog tako i životinjskog porijekla, a osobito u izolatima iz peradi. Obzirom da se geni koji kodiraju tvorbu ovih enzima većinom nalaze na plazmidima, lako se prenose iz jedne bakterijske stanice u drugu unutar iste, ali i između različitih bakterijskih vrsta. Uz njih se na istom plazmidu često nalaze i geni odgovorni za rezistenciju na lijekove drugih skupina, kao što su aminoglikozidi, tetraciklini i sulfonamidi, što sojeve čini multirezistentnima (MDR, engl. *multi-drug resistant*). Multirezistencija podrazumijeva stečenu otpornost bakterija na najmanje jedan antibiotik iz tri ili više skupina antimikrobnih lijekova. Takvi sojevi predstavljaju izrazito veliku opasnost za javno zdravlje i dodatno otežavaju mogućnost liječenja jer za njih gotovo da ne postoji djelotvorna terapija. Upravo stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organization*) 2017. godine uvrstila sojeve *E. coli* koji istovremeno tvore ESBL i karbapenemaze, enzime koji djeluju na karbapeneme, na listu mikroba koji ugrožavaju ljudsko zdravlje i zbog kojih je potrebno proizvesti nove antimikrobne lijekove.

Infekcije uzrokovane ESBL pozitivnim sojevima *E. coli* u velikom su porastu kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini. U humanoj medicini riječ je uglavnom o bolničkim infekcijama kod kojih je visoka stopa smrtnosti često posljedica neodgovarajuće terapije, jer većina uobičajeno korištenih antimikrobnih lijekova ne djeluje na multirezistentne bolničke sojeve.

Dosad su u veterinarskoj medicini ESBL pozitivni sojevi *E. coli* izdvojeni iz gotovo svih farmских životinja, a visoka stopa pojavnosti osobito je uočena u peradi i mesu porijeklom od peradi. Stoga se životinje i njihovi proizvodi smatraju važnim rezervoarom gena odgovornih za rezistenciju. Osim toga, brojna istraživanja ukazuju na prisutnost ESBL sojeva kod kućnih ljubimaca, pa je bliski kontakt s vlasnicima jedan od ključnih čimbenika koji pogoduje širenju rezistentnih bakterija. U svrhu sprečavanja širenja ESBL pozitivnih sojeva *E. coli* nužno je zajedničko djelovanje i suradnja kliničara i mikrobiologa kako bi se pravovremeno uočila rezistencija izolata i izabrala odgovarajuća antimikrobna terapija.

Značajnost i proširenost infekcija uzrokovanih ESBL izolatima *E. coli* u domaćih životinja na globalnoj razini tek treba procijeniti, ali uloga životinja kao rezervoara u širenju rezistentnih bakterija zahtijeva nadzor kroz multidisciplinarni pristup „Jedno zdravlje“ (engl. *One Health*) kako bi se ovaj rastući problem pokušao držati pod kontrolom.

## **2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE**



## 2.1. Bakterijska vrsta *Escherichia coli*

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) je gram-negativna štapićasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* i čini značajan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, no istovremeno je i jedan od najčešćih uzročnika infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini.

Sojevi bakterije *E. coli* mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine komenzali koji, kao dio crijevne mikrobiote, za zdrav organizam nisu štetni. Drugoj skupini pripadaju patogeni sojevi koji uzrokuju crijevne i izvancrijevne infekcije u zdravih jedinki (VILA i sur., 2016.).

Sojevi koji uzrokuju izvancrijevne infekcije (ExPEC, engl. *extra-intestinal pathogenic E. coli*) najčešće kao komenzali borave u crijevu zdravih životinja, ali u pogodnim uvjetima mogu uzrokovati različite lokalne ili sustavne patološke promjene izvan probavnog sustava (RUSSO i JOHNSON, 2000.). Najčešće su to infekcije mokraćnog sustava (UPEC, engl. *uropathogenic E. coli*), meningitis novorođenčadi (NMEC, engl. *neonatal-meningitis associated E. coli*), septikemija (SePEC, engl. *septicaemia associated E. coli*), a među uzročnike izvancrijevnih infekcija ubrajaju se i ptičji patogeni sojevi (APEC, engl. *avian pathogenic E. coli*) (MOULIN- SCHOULEUR i sur., 2007.).

Sojevi *E. coli* koji uzrokuju crijevne infekcije uglavnom nisu dio crijevne mikrobiote zdravih jedinki i rijetko će uzrokovati infekcije izvan probavnog sustava. Ovisno o čimbenicima virulencije koje posjeduju, a koji utječu na tijek patogeneze i kliničku sliku, sojevi koji uzrokuju crijevne infekcije se mogu podijeliti na enteropatogene (EPEC, engl. *enteropathogenic E. coli*), enterohemoragične (EHEC, engl. *enterohaemorrhagic E. coli*), enterotoksigene (ETEC, engl. *enterotoxigenic E. coli*), enteroagregativne (EAEC, engl. *enteroaggregative E. coli*), enteroinvazivne (EIEC, engl. *enteroinvasive E. coli*) te difuzno adherentne sojeve *E. coli* (DAEC, engl. *diffusely adherent E. coli*) (LIU i sur., 2020.).

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju kolibacilozu peradi odnosno različite lokalizirane i sistemske infekcije kao što su koliseptikemija, respiratorne infekcije, upala zračnih vrećica, sindrom otečene glave, peritonitis, salpingitis i upala žumanjčane vrećice. Najčešći su problem na farmama peradi gdje izazivaju velike gospodarske štete i značajne ekonomske gubitke (KOUTSIANOS i sur., 2022.).

Bakterija *E. coli* u okoliš dospjeva putem fecesa te kontaminira tlo, vode, biljke i predmete gdje može preživjeti mjesecima (MARKEY i sur., 2013.). Patogeni sojevi *E. coli* mogu dospjeti u okoliš i putem gnojiva i drugog životinjskog otpada kao i putem otpadnih voda iz klaonica (JANG i sur., 2017.). Kontaminiranom vodom i hranom patogeni sojevi *E. coli* se prenose na životinje i ljude, a u širenju sudjeluju i životinje i ljudi kliconoše (DOI i sur., 2017.).

Obzirom na ovu međusobnu povezanost okoliša, životinja i ljudi neophodna je multidisciplinarna suradnja u okviru koncepta „Jedno zdravlje“ u svrhu kontrole i suzbijanja širenja patogenih sojeva *E. coli*, a s ciljem zaštite zdravlja i ljudi i životinja te očuvanja okoliša.

### **2.1.1. Morfološke, uzgojne i biokemijske osobine vrste *E. coli***

Vrsta *E. coli* je fakultativno anaerobna bakterija i lako se uzgaja na uobičajenim bakteriološkim hranjivim podlogama. Većina sojeva ove bakterijske vrste je pokretljiva. Optimalna temperatura za rast je 37 °C iako se može uzgajati pri temperaturama od 20 °C do 44 °C. Nakon 24-satne inkubacije na čvrstim hranjivim podlogama izrastu okrugle kolonije glatkih rubova koje su sjajne i sivkastobijele boje promjera 2-3 mm, S-oblika (S, engl. *smooth*). Osim njih, javljaju se i R-oblici kolonija (R, engl. *rough*) koje su manje, hrapave površine i suhe te se teško suspendiraju u fiziološkoj otopini (NAGLIĆ i sur., 2005.).

Patogeni sojevi *E. coli* često tvore hemolizu na agaru s dodatkom ovčje krvi, a mogu rasti i na brojnim selektivnim podlogama, kao što su MacConkey agar i Eozin metilen-plavi agar (EMB, engl. *Eosin methylene blue*) te različite komercijalno dostupne kromogene podloge (MARKEY i sur., 2013.). Bakterija *E. coli* fermentira laktozu, ima sposobnost tvorbe indola iz triptofana i ne tvori citokrom-oksidadu.

### **2.1.2. Identifikacija vrste *E. coli***

Bakterijsku vrstu *E. coli* može se jednostavno i brzo identificirati na temelju morfoloških, uzgojnih i biokemijskih osobina te pomoću kratkog biokemijskog niza poznatog pod nazivom IMViC koji uključuje test tvorbe indola, test s metilnim crvenilom (MR-test, engl. *Methyl Red test*), Voges-Proskauerov test (VP-test) i test korištenja citrata. Sojevi *E. coli* tvore indol iz triptofana te daju pozitivan rezultat testa tvorbe indola. Test s metilnim crvenilom

temelji se na dokazu tvorbe kiselina iz šećera. U tu svrhu upotrebljava se metilno crvenilo koje je indikator promjene pH. Bakterija *E. coli* koristi šećere tvoreći kiselinu što daje pozitivan rezultat ovom testu. Voges-Proskauerov test koristi se za dokaz tvorbe acetoina kao produkta fermentacije šećera što kod vrste *E. coli* nije slučaj pa je rezultat ovog testa negativan. U testu korištenja citrata dokazuje se sposobnost bakterije da se koristi citratom kao jedinim izvorom ugljika. Sojevi bakterije *E. coli* su citrat negativni. Rezultati ovog kratkog biokemijskog niza daju sojevima *E. coli* IMViC-formulu (indol+/MR+/VP-/citrat-) prema kojoj se razlikuju od ostalih najučestalijih laktoza pozitivnih enterobakterija (MARKEY i sur., 2013.).

Za identifikaciju vrste može se upotrijebiti i komercijalni set za biokemijsku identifikaciju bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* API 20E (bioMerieux, Francuska).

### **2.1.3. Antigenske osobine vrste *E. coli***

Bakterija *E. coli* posjeduje kapsularne (K), somatske (O), flagelarne (H) i fimbrijske (F) antigene. Kapsularni antigeni su polisaharidi kapsule, somatske antigene čine lipopolisaharidi koji se nalaze na površini stanične stijenke, a flagelarni i fimbrijski antigeni su bjelančevine.

Neki od fimbrijskih antigena, F4 (K88) i F5 (K99) imaju ulogu adhezina koji omogućavaju patogenim sojevima vrste *E. coli* adherenciju na crijevne stanice i kolonizaciju tankog crijeva (MARKEY i sur., 2013.).

Postupkom serološke tipizacije na temelju O, H i K antigena određuju se serotipovi bakterije *E. coli* što je važno u dijagnostici bolesti uzrokovanih ovim sojevima (MARKEY i sur., 2013.). Na temelju kombinacije O i H antigena ustanovljeno je preko 700 serotipova bakterije *E. coli* od kojih je serotip O157:H7 prepoznat kao najznačajniji uzročnik bolesti koje se prenose kontaminiranom vodom i hranom (JANG i sur., 2017.).

## 2.2. Osjetljivost bakterijske vrste *E. coli* na antimikrobne lijekove

Bakterija *E. coli* urođeno je osjetljiva na mnoge antimikrobne lijekove pa se u liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom primjenjuju beta-laktamski antibiotici, fluorokinoloni, aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini i nitrofurantoin (DOI i sur., 2017.). Međutim, prekomjerna i često neodgovarajuća primjena antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova.

Enterobakterije mogu stjecati rezistenciju promjenom ciljnog mjesta vezanja lijeka, proizvodnjom enzima koji inaktiviraju lijek, mehanizmom pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice i smanjenom propusnošću stanične stijenke za prolaz antimikrobnog lijeka.

Kod vrste *E. coli* osobito je značajna stečena rezistencija na beta-laktamske antimikrobne lijekove koji se najčešće primjenjuju u liječenju infekcija zbog njihova širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti.

### 2.2.1. Mehanizmi rezistencije na beta-laktamske antimikrobne lijekove

Beta-laktamski antimikrobni lijekovi u svojoj strukturi sadrže beta-laktamski prsten, a dijele se na peniciline, cefalosporine te ostale beta-laktamske antibiotike (inhibitore beta-laktamaza, karbapeneme i monobaktame) (GIGUÈRE i sur., 2013.). Njihovo djelovanje temelji se na inhibiciji sinteze bakterijske stanične stijenke tako što koče djelovanje enzima koji sudjeluju u završnoj fazi sinteze peptidoglikana, osnovne komponente prokariotske stanične stijenke. Ti enzimi (transpeptidaze, karboksipeptidaze i ostali enzimi neophodni u završnoj fazi sinteze peptidoglikana) poznati su kao proteini koji vežu peniciline (PBP, engl. *penicillin binding proteins*) (ŠEOL i sur., 2010.). Bakterijska stanična stijenka s vanjske strane okružuje staničnu membranu i štiti unutarne dijelove bakterijske stanice od štetnih utjecaja iz okoliša, a peptidoglikan je odgovoran za njenu čvrstoću i održavanje unutarstaničnog osmotskog tlaka pa vezanje beta-laktamskih antibiotika na PBP molekule rezultira propadanjem stanice (ŠEOL i sur., 2010.).

Postoje različiti mehanizmi pomoću kojih enterobakterije postaju rezistentne na beta-laktamske antimikrobne lijekove, a najvažniji su: inaktivacija antimikrobnih lijekova pomoću enzima, smanjenje propusnosti bakterijske stijenke, promjena ciljnog mjesta na stanici, i smanjenje unutarstaničnog nagomilavanja antibiotika (ŠEOL i sur., 2010.).

Enzimaska inaktivacija zasniva se na sposobnosti bakterija da proizvedu enzime kojima razgrade antibiotik (ŠEOL i sur., 2010.).

Do smanjene propusnosti bakterijske stijenke za beta-laktamske antimikrobne lijekove dolazi zbog promjene ili čak potpunog gubitka otvora (pora) na staničnoj stijenci kroz koje ulaze u bakterijsku stanicu odnosno gubitka porinskih proteina pomoću kojih beta-laktamski antimikrobni lijekovi prodiru u staničnu stijenku bakterije (ŠEOL i sur., 2010.).

Promjena ciljnog mjesta je mehanizam rezistencije koji podrazumijeva promjenu građe ili prikriivanje receptora u bakterijskoj stanici na koji se antimikrobni lijekovi vežu (bakterijski protein ili neki dio strukture stanične membrane), pa se vežu sa smanjenim afinitetom ili se više ne mogu vezati na ciljno mjesto i djelovati na bakteriju (ŠEOL i sur., 2010.).

Smanjena količina antimikrobnog lijeka u stanici može biti posljedica pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice aktivacijom transportnog sustava ovisnog o energiji (stanične pumpe) (ŠEOL i sur., 2010.).

Kod gram-negativnih bakterija, pa tako i kod vrste *E. coli*, najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame je tvorba enzima beta-laktamaza koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika čineći ga nedjelotvornim (ANDRAŠEVIĆ i sur., 2009.).

### **2.3. Beta-laktamaze**

Beta-laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom razgrađuju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema, a proizvode ih i gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Beta-laktamaze gram-negativnih bakterija nalaze se u periplazmatskom prostoru bakterijske stanice te inaktiviraju antibiotik prije nego što stigne do ciljnog mjesta, dok gram-pozitivne bakterije uglavnom proizvode ekstracelularne beta-laktamaze (LIVERMORE, 1995.).

Prema građi i načinu djelovanja mogu se podijeliti u dvije skupine. U prvoj skupini su beta-laktamaze sa serinskim aktivnim mjestom, dok drugu skupinu čine beta-laktamaze s ionima cinka. Beta-laktamaze sa serinskim aktivnim mjestom inaktiviraju peniciline, cefalosporine i monobaktame, a beta-laktamaze koje pomoću iona cinka ( $Zn^{2+}$ ) inaktiviraju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina i karbapenema čine manji broj beta-laktamaza i

nazivaju se metalo-beta-laktamaze (MBLs, engl. *metallo-beta-lactamases*) (LIVERMORE, 1995.).

Djelotvornost beta-laktamaza ovisi o njihovu afinitetu za određeni supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini izlučenoga enzima i propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija (BEDENIĆ, 2004.).

### **2.3.1. Genetsko porijeklo beta-laktamaza**

Prema smještaju gena koji ih kodiraju, beta-laktamaze mogu biti kromosomske ili plazmidne. Kromosomske beta-laktamaze kodiraju geni smješteni na bakterijskom kromosomu, a rezistencija koju uzrokuju može biti konstitutivna ili inducibilna. Konstitutivne beta-laktamaze neprekidno se stvaraju neovisno o tome nalazi li se bakterijska stanica u prisutnosti antibiotika. Inducibilne beta-laktamaze stvaraju se u značajnim količinama samo kada je bakterijska stanica izložena djelovanju beta-laktamskih antibiotika (LIVERMORE, 1995.).

Plazmidne beta-laktamaze kodiraju geni smješteni najčešće na plazmidima, ali i drugim prenosivim genskim elementima. Rezistencija koju uzrokuju može se prenijeti iz jedne bakterijske stanice u drugu i, za razliku od kromosomskih beta-laktamaza, plazmidne beta-laktamaze nisu specifične za vrstu pa se mogu širiti među različitim bakterijskim vrstama i rodovima (SAMAH-KFOURY i ARAY, 2003.). Između gram-negativnih bakterija šire se konjugacijom, a između gram-pozitivnih transdukcijom pomoću bakteriofaga (WU i sur., 1994.).

### **2.3.2. Povijesni pregled pojave beta-laktamaza**

Uvođenjem penicilina G, prvog beta-laktama, u kliničku upotrebu 1944. godine započelo je selekcijsko djelovanje na stafilokoke koji su nosili plazmidne gene za penicilinaze pa je sredinom 80-ih godina više od 90 % stafilokoka bilo otporno na penicilin (BRADFORD, 2001.). Šezdesetih godina prošlog stoljeća u kliničku upotrebu uvedeni su beta-laktami djelotvorni i protiv gram-negativnih bakterija što je dovelo do pojave prve plazmidne beta-laktamaze šireg spektra od penicilinaza i rezistencije na peniciline i cefalosporine prve

generacije. Dokazana je kod *E. coli* izdvojene iz krvi pacijentice Temoniera prema kojoj je enzim dobio naziv TEM-1 (DATTA i KONTOMICHALOU, 1965.). Nekoliko godina kasnije, u izolatu bakterijske vrste *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), otkrivena je beta-laktamaza TEM-2 koja se od TEM-1 razlikuje u aminokiselinskom slijedu pa je na poziciji 37 glutamin zamijenjen serinom (MEDEIROS, 1997.). Kanije, 1974. godine, opisana je i SHV-1 beta-laktamaza (SHV, engl. *sulphydryl variable  $\beta$ -lactamase*) koja je kod većine izolata bakterijske vrste *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) kodirana kromosomskim genima, dok je kod vrste *E. coli* kodirana genima smještenim na plazmidima (BRADFORD, 2001.).

Dvadesetak godina nakon otkrića prvih plazmidnih beta-laktamaza proizvedeni su novi beta-laktamski antimikrobni lijekovi otporni na hidrolitičko djelovanje TEM-1 i SHV-1 beta-laktamaza. Tada se za liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama počinju primjenjivati oksiiimino-cefalosporini, pripadnici treće generacije cefalosporina (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson). Međutim, njihova pretjerana upotreba je, zbog selekcijskog pritiska, rezultirala pojavom mutacija u genima za TEM i SHV enzime što je omogućilo prilagodbu bakterija na nove beta-laktame (BRADFORD, 2001.). Novonastali enzimi TEM i SHV porodice hidroliziraju cefalosporine prve, druge i treće generacije, aminopeniciline i monobaktame, ali ne i karbapeneme, a osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza: klavulansku kiselinu, tazobaktam i sulbaktam (GNIADKOWSKY, 2001.; BEDENIĆ, 2004.; PATTERSON i BONOMO, 2005.).

Prvi u nizu novih beta-laktamaza, enzim SHV-2 djelovao je na sve tada postojeće cefalosporine pa su takvi enzimi nazvani beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) (KLIEBE i sur., 1985.).

Brzo nakon pojave novih varijanti enzima TEM i SHV otkrivena je nova skupina enzima nazvana CTX-M zbog visokog afiniteta za cefotaksim. Ova skupina beta-laktamaza proširila se vrlo brzo i danas je dominantna skupina beta-laktamaza proširenog spektra (POIREL i sur., 2002.).

Osim TEM, SHV i CTX-M skupina, dokazane su i brojne nesrodne beta-laktamaze sličnog proširenog spektra djelovanja. Enzimi OXA skupine djeluju na oksiiimino-cefalosporine, ali ih slabije inhibira klavulanska kiselina. Plazmidne AmpC cefalosporinaze djeluju na cefalosporine, a otporne su na djelovanje klavulanske kiseline. Enzimi iz GES

skupine imaju iste osobine kao ESBL, ali s proširenim djelovanjem i na karbapeneme (BRADFORD, 2001.; PHILIPPON, 2002.; QUEENAN i BUSH, 2007.).

### **2.3.3. Podjela beta-laktamaza**

Osim prema genetskom porijeklu i načinu ekspresije aktivnosti, beta-laktamaze možemo podijeliti prema funkcionalnim i molekularnim značajkama.

Više je različitih funkcionalnih podjela koje se temelje na hidrolitičkoj aktivnosti enzima (supstratnom profilu), osjetljivosti na inhibitore beta-laktamaza, izoelektričnoj točki i molekularnoj težini. Molekularna podjela temelji se na određivanju slijeda aminokiselina (AMBLER, 1980.; BUSH i sur., 1995.).

#### **2.3.3.1. Funkcionalna podjela beta-laktamaza**

Brojne podjele temeljene na funkcionalnim osobinama enzima, kao što su hidrolitička aktivnost enzima i osjetljivost na inhibitore, imale su mnoge nedostatke koji su doveli do nemogućnosti razlikovanja originalnih enzima (TEM, SHV) od njihovih sve brojnijih varijanti. To je dovelo do reorganizacije podjele pa je 1989. godine postojeća podjela beta-laktamaza proširena, a zatim i upotpunjena 1995. i 2010. godine. Danas je u primjeni dopunjena funkcionalna podjela iz 2010. godine (BUSH, 1989.; BUSH i sur., 1995.; BUSH i JACOBY, 2010.).

Supstratni profil određuje se na temelju brzine razgradnje određenog supstrata, pa se prema njemu mogu razlikovati penicilinaze, cefalosporinaze i drugi enzimi. Nedostatak ovakve podjele nalazi se u činjenici da točkaste mutacije gena koji kodiraju za beta-laktamaze značajno mijenjaju specifičnost prema supstratu i osjetljivost na inhibitore te na taj način mijenjaju grupu u koju je enzim prvotno svrstan (BEDENIĆ, 2004.).

Prema dopunjenoj funkcionalnoj podjeli skupina 1 obuhvaća kromosomski kodirane cefalosporinaze brojnih enterobakterija koje prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi C. Bolje hidroliziraju cefalosporine od penicilina, nisu inhibirane klavulanskom kiselinom i dobro razgrađuju cefamicine, poput cefoksitina. Kad se izlučuju u velikoj količini mogu uzrokovati rezistenciju na karbapeneme, osobito na ertapenem. Unutar ove skupine nalazi se podskupina



Ie s boljom hidrolizom ceftazidima i drugih oksiiimino-cefalosporina koja prema molekularnoj podjeli također pripada skupini C. Enzimi ove podskupine nazivaju se AmpC beta-laktamaze proširenoga spektra.

Skupina 2, sa serinskim beta-laktamazama, uključuje skupine A i D prema molekularnoj podjeli i predstavlja najveću skupinu beta-laktamaza. Čini ju 12 podskupina.

Podskupina 2a je skupina enzima s ograničenim spektrom hidrolitičke aktivnosti usmjerenim većinom prema penicilinima, a prisutni su kod stafilokoka i enterokoka. Prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A. Većina tih enzima kromosomskog je podrijetla, osim malog broja stafilokoknih penicilinaza koje mogu biti kodirane plazmidima.

Beta-laktamaze iz podskupine 2b podjednako hidroliziraju peniciline i cefalosporine starijih generacija, poput cefaloridina i cefalotina, dobro su inhibirane klavulanskom kiselinom i tazobaktamom, a prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

Podskupina 2be sadrži ESBL enzime koji imaju iste supstrate kao i enzimi iz podskupine 2b, ali hidroliziraju i oksiiimino-cefalosporine (cefotaksim, ceftazidim i aztreonam), monobaktame (aztreonam) i cefalosporine četvrte generacije (cefepim). U podskupini 2be nalaze se enzimi nastali zamjenom aminokiselinskog slijeda u enzimima TEM-1, TEM-2 i SHV-1 što je proširilo spektar njihove hidrolitičke aktivnosti uz posljedično smanjenje aktivnosti prema benzilpenicilinu i cefaloridinu. Skupinama TEM i SHV beta-laktamaza proširenoga spektra pridružila se funkcionalno slična skupina CTX-M enzima. U ovoj podskupini nalaze se i rjeđe opisivane ESBL kao što su BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1 i TLA-2 enzimi.

Podskupina 2br obuhvaća beta-laktamaze proširenog spektra otporne na klavulansku kiselinu i slične inhibitore, ali istog spektra djelovanja koju imaju ostali enzimi iz skupine 2b. Prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

Podskupina 2ber uključuje TEM enzime koji iskazuju sposobnost pojačane hidrolize cefalosporina proširenoga spektra kombinirane s umjerenom rezistencijom na klavulansku kiselinu. Prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

Podskupinu 2c čine penicilinaze hidrolitički aktivne prema benzilpenicilinu, karbenicilinu, tikarcilinu, kloksacilinu i oksacilinu. Inhibira ih klavulanska kiselina ili tazobaktam, a prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

Podskupinu 2ce karakteriziraju karbencilinaze proširenoga spektra s hidrolitičkom aktivnošću prema cefepimu i cefpiromu. Inhibiraju ih klavulanska kiselina i tazobaktam, a prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

Podskupina 2d uključuje beta-laktamaze koje odlikuje brža hidroliza kloksacilina i oksacilina nego benzilpenicilina i poznati su pod nazivom OXA (engl. *oxacillin hydrolysing*). Vrlo dobro hidroliziraju i karbencilin, a veliki broj enzima iz ove skupine inhibiran je natrijevim kloridom. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi D.

Podskupina 2de obuhvaća enzime proširenoga spektra djelovanja koji hidroliziraju kloksacilin ili oksacilin, oksiimino-cefalosporine, ali ne i karbapeneme. Većina enzima iz ove podskupine su derivati OXA-10 enzima. Bolje hidroliziraju ceftazidim u odnosu na cefotaksim ili aztreonam, međutim izolati koji tvore enzime OXA-1 ili OXA-31 mogu biti osjetljivi na ceftazidim, a otporni na cefepim. Prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini D.

Podskupinu 2df čine OXA enzimi koji posjeduju sposobnost hidrolize karbapenema. Najčešće se opisuju kod izolata vrste *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) i kodirani su genima smještenim na kromosomu, a prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini D.

Podskupina 2e obuhvaća cefalosporinaze proširenoga spektra koje inhibira klavulanska kiselina ili tazobaktam. Predstavnici ove skupine su inducibilne, kromosomske cefalosporinaze bakterijske vrste *Proteus spp.* koje se mogu zamijeniti za skupinu 1 AmpC enzima ili za ESBL enzime, jer ih proizvode izolati sličnog profila rezistencije. Mnogi od tih enzima danas su definirani kao ESBL, a prema molekularnoj podjeli pripadaju skupini A.

U podskupinu 2f smještene su serinske karbapenemaze koje pripadaju molekularnoj skupini A. Osnovni supstrat ovih enzima su karbapenemi, a bolje ih inhibira tazobaktam od klavulanske kiseline. Pojedini enzimi ove skupine, poput SME i IMI-1 enzima, slabo hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra, ali dobro hidroliziraju aztreonam. Enzimi iz porodice SME, kao i IMI-1 i NMC-1 beta-laktamaze kodirani su genima smještenim na kromosomima, a u podskupini 2f nalaze se i plazmidne beta-laktamaze kao što su karbapenemaze nazvane KPC prema bakterijskoj vrsti *K. pneumoniae* (KPC, engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*).

Skupina 3 obuhvaća jedinstvenu skupinu enzima, metalo-beta-laktamaze koje se razlikuju od drugih beta-laktamaza po tome što sadrže cink na aktivnome mjestu, a prema

molekularnoj podjeli pripadaju skupini B. Za razliku od serinskih beta-laktamaza ne hidroliziraju monobaktame, a klavulanska kiselina i tazobaktam ih ne inhibiraju. Klinički najvažniji predstavnici ove skupine su enzimi iz grupa VIM-1 i IMP-1. Metalo-beta-laktamaze skupine 3 dodatno su podijeljene na tri molekularne (B1, B2 i B3) i tri funkcionalne podskupine (3a, 3b i 3c).

Navedene skupine enzima prikazane su u tablici 1.

Tablica.1 Dopunjena funkcionalna podjela beta-laktamaza prema Bush i Jacoby (BUSH i JACOBY, 2010.)

Skupina enzima	Molekularna skupina (podskupina)	Supstrati	Inhibirani s		Osobine	Tipični predstavnici
			KK ili TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	C	Cefalosporini	Ne	Ne	Bolja hidroliza cefalosporina nego benzilpenicilina; hidroliza cefamicina	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporini	Ne	Ne	Povećana hidroliza ceftazidima i često drugih oksiiimino-cefalosporina	GC1 CMY-37
2a	A	Penicilini	Da	Ne	Bolja hidroliza benzilpenicilina nego cefalosporina	PC1
2b	A	Penicilini, stariji cefalosporini	Da	Ne	Podjednaka hidroliza benzilpenicilina i cefalosporina	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Cefalosporini proširenog spektra, monobaktami	Da	Ne	Povećana hidroliza oksiiimino-cefalosporina (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, cefepim, aztreonam)	TEM-3 SHV-2 CTX-M-15 PER-1 VEB-1
2br	A	Penicilini	Ne	Ne	Rezistencija na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam	TEM-30 SHV-10

<sup>a</sup>KK-klavulanska kiselina; TZB-tazobaktam

(nastavlja se)

Tablica.1 Dopunjena funkcionalna podjela beta-laktamaza prema Bush i Jacoby (BUSH i JACOBY, 2010.) (nastavak)

Skupina enzima	Molekularna skupina (podskupina)	Supstrati	Inhibirani s		Osobine	Tipični predstavnici
			KK ili TZB <sup>a</sup>	EDTA		
2ber	A	Cefalosporini proširenog spektra, monobaktami	Ne	Ne	Pojačana hidroliza oksimino-cefalosporina kombinirana s rezistencijom na klavulansku kiselinu, sulbaktam i azobaktam	TEM-50
2c	A	Karbenicilin	Da	Ne	Pojačana hidroliza karbenicilina	PSE-1 CARB-3
2ce	A	Karbenicilin, cefepim	Da	Ne	Pojačana hidroliza karbenicilina, cefepima i cefpiroma	RTG-4
2d	D	Kloksacilin	Varijabilno	Ne	Pojačana hidroliza kloksacilina ili oksacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporini proširenog spektra	Varijabilno	Ne	Hidroliza kloksacilina ili oksacilina i oksimino-cefalosporina	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemi	Varijabilno	Ne	Hidroliza kloksacilina ili oksacilina i karbapenema	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporini proširenog spektra	Da	Ne	Hidroliza cefalosporina; inhibirani s klavulanskom kiselinom, ali ne i aztreonamom	CepA
2f	A	Karbapenemi	Varijabilno	Ne	Povećana hidroliza karbapenema, oksimino-cefalosporina, cefamicina	KPC-2, IMI-1, SME-1

<sup>a</sup>KK-klavulanska kiselina; TZB-tazobaktam

(nastavlja se)

Tablica.1 Dopunjena funkcionalna podjela beta-laktamaza prema Bush i Jacoby (BUSH i JACOBY, 2010.) (nastavak)

Skupina enzima	Molekularna skupina (podskupina)	Supstrati	Inhibirani s		Osobine	Tipični predstavnici
			KK ili TZB <sup>a</sup>	EDTA		
3a	B (B1)	Karbapenemi	Ne	Da	Hidroliza širokoga spektra uključujući karbapeneme, ali ne i monobaktame	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Karbapenemi	Ne	Da	Hidroliza karbapenema	CphA, Sfh-1

<sup>a</sup>KK-klavulanska kiselina; TZB-tazobaktam

### 2.3.3.2. Molekularna podjela beta-laktamaza

Molekularna podjela temelji se na određivanju slijeda nukleotida i aminokiselina, pa podjela prema Ambleru dijeli beta-laktamaze u četiri skupine označene slovima od A do D (AMBLER, 1980.). Skupini A, C i D pripadaju serinske beta-laktamaze koje na svom aktivnom mjestu posjeduju aminokiselinu serin. U skupinu A svrstane su penicilinaze koje hidroliziraju peniciline i starije cefalosporine, beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) koje hidroliziraju novije cefalosporine te karbapenemaze koje hidroliziraju peniciline, cefalosporine i karbapeneme. Skupini C pripadaju cefalosporinaze i AmpC beta-laktamaze proširenog spektra s boljim hidrolitičkim djelovanjem na cefalosporine nego peniciline. U skupini D nalaze se oksicilinaze koje hidroliziraju kloksacilin i oksacilin, ali i beta-laktamaze koje mogu hidrolizirati karbapeneme.

Skupinu B čine metalo-beta-laktamaze koje za svoju aktivnost zahtijevaju cinkove ione i koje mogu hidrolizirati široki spektar antibiotika uključujući sve beta-laktamske antimikrobne lijekove osim aztreonama (GNIADKOWSKY, 2008.; SHAH, 2004.; BUSH i JACOBY, 2010.).

## 2.4. Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL)

Većina ESBL su derivati TEM ili SHV enzima i nalazimo ih kod bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, najčešće *E. coli* i *K. pneumoniae*. Njihovo širenje započinje 80-tih godina prošlog stoljeća nakon uvođenja cefalosporina treće generacije u kliničku primjenu. Uzrok su rezistencije na peniciline, cefalosporine (uključujući treću i četvrtu generaciju) i monobaktame (aztreonam), ali ne i na cefamicine (cefoksitin) i karbapeneme (PATTERSON i BONOMO, 2005.). Sojevi koji tvore ESBL osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (GNIADKOWSKY, 2001.).

Prema nadopunjenoj funkcionalnoj podjeli iz 2010. godine ESBL pripadaju skupini 2 i njenim podskupinama 2be, 2ber, 2de i 2e (BUSH i JACOBY, 2010.). Prema Amblerovoj klasifikaciji svrstane su u molekularnu skupinu A uz iznimku OXA grupe enzima koja se nalazi u skupini D (AMBLER i sur., 1991.).

### 2.4.1. TEM beta-laktamaze proširenog spektra

Sve TEM beta-laktamaze potječu od prve otkrivene plazmidne beta-laktamaze TEM-1 opisane 60-ih godina prošlog stoljeća (DATTA i KONTOMICHALOU, 1965.; CASTANHEIRA i sur., 2021.). Kod gotovo 90 % sojeva *E. coli* rezistentnih na ampicilin, rezistencija je posredovana TEM-1 beta-laktamazom (LIVERMORE, 1995.). Osim na ampicilin, ova beta-laktamaza uzrokuje i rezistenciju na penicilin te cefalosporine starijih generacija, poput cefalotina i cefaloridina (BRADFORD, 2001.). Enzim TEM-2 je prvi derivat TEM-1 beta-laktamaze od koje se razlikuje po samo jednoj promjeni u aminokiselinskom sastavu, a koja nije uzrokovala promjenu supstratnog profila (BRADFORD, 2001.). Beta-laktamaza TEM-3, izdvojena 1988. godine, prva je beta-laktamaza koja rezistentnom soju daje ESBL fenotip (SOUGAKOFF i sur., 1988.). Nastala je od TEM-2 beta-laktamaze kao posljedica točkastih mutacija koje su uzrokovale razliku u dvije aminokiseline u proteinskom slijedu: mutacija na kodonu 102 promijenila je aminokiselinu glutamin u aminokiselinu lizin, a na kodonu 236 aminokiselinu glicin u aminokiselinu serin (SOUGAKOFF i sur., 1988.).

Daljnje točkaste mutacije na različitim pozicijama rezultirale su velikim brojem različitih TEM beta-laktamaza pa je do danas opisano preko 240 različitih TEM enzima, ali ne uzrokuju svi ESBL fenotip (HUJER i sur., 2001.; CASTANHEIRA i sur., 2021.). Neke od novijih TEM beta-laktamaza imaju neznatne promjene supstratnog profila, poput TEM-184,

koja učinkovitije hidrolizira aztreonam od ceftazidima ili cefotaksima (CASTANHEIRA i sur., 2021.). Iako se najčešće opisuju kod enterobakterija, posebice u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*, opisane su i kod gram-negativnih bakterija koje ne pripadaju toj porodici (BRADFORD, 2001.). Primjerice, TEM-42 beta-laktamaza pronađena je kod vrste *P. aeruginosa* (MUGNIER i sur., 1996.).

#### **2.4.2. SHV beta-laktamaze proširenog spektra**

Nedugo nakon otkrića TEM-1 opisana je prva SHV beta-laktamaza u bakterijske vrste *K. pneumoniae* kod koje je ovaj enzim kodiran genima smještnim na bakterijskom kromosomu. Kod ostalih bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, SHV beta-laktamaza kodirana je plazmidnim genima (LIVERMORE, 1995.; BRADFORD, 2001.).

Prva ESBL varijanta beta-laktamaze SHV opisana je u Njemačkoj, u izolatu vrste *Klebsiella ozaenae*, a od SHV-1 enzima se razlikuje u samo jednoj aminokiselini te je nazvana SHV-2 (PATERSON i BONOMO, 2005.). Do danas je dokazano preko 200 različitih SHV beta-laktamaza, a većina ih uzrokuje ESBL fenotip (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

#### **2.4.3. CTX-M beta-laktamaze proširenog spektra**

CTX-M skupina beta-laktamaza je novija skupina plazmidnih ESBL koja ima veći afinitet prema cefotaksimu nego prema ceftazidimu pa su prema tome enzimi ove skupine nazvani cefotaksimaze ili CTX-M beta-laktamaze (POIREL i sur., 2002.; DUTOUR i sur., 2002.). Hidroliziraju cefalotin ili cefaloridin bolje od benzilpenicilina, a osjetljivi su na inhibitore beta-laktamaza, osobito tazobaktam koji ih inhibira bolje nego sulbaktam ili klavulanska kiselina (BRADFORD i sur., 1998.; BRADFORD, 2001.).

Smatra se da su CTX-M enzimi potekli od kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterijske vrste *Kluyvera ascorbata*, a s TEM i SHV beta-laktamazama nisu srodne jer imaju samo oko 40% sličnosti u slijedu aminokiselina (BRADFORD, 2001.). Prva CTX-M beta-laktamaza, nazvana CTX-M-1, otkrivena je 1989. godine u Njemačkoj u izolatu bakterije *E. coli* (BAUERNFEIND i sur., 1990.). Slijedi otkriće niza sličnih enzima rezistentnih na cefotaksim koji se danas prema svom aminokiselinskom sastavu dijele u nekoliko skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

Najčešće beta-laktamaze iz skupine CTX-M-1 su CTX-M-15, a potom CTX-M-3 i CTX-M-1 beta-laktamaze. CTX-M-2, CTX-M-8 kao i CTX-M-25 beta-laktamaze najčešće su unutar svojih skupina. U skupini CTX-M-9 najčešće su CTX-M-9 i CTX-M-14, dok se prema istraživanjima sve češće dokazuje i CTX-M-27 beta-laktamaza (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

Početakom 2000-ih godina plazmida s genima za enzime ove skupine ubrzano se šire pa su danas CTX-M beta-laktamaze proširenog spektra najrasprostranjenija skupina ESBL u izolatima humanog i životinjskog podrijetla (VALENTIN i sur., 2014.; BEDENIĆ i sur., 2015.; GUNDRAN i sur., 2019.).

Različite varijante enzima CTX-M različito su geografski zastupljene. Beta-laktamaze iz skupine CTX-M-1 najzastupljenije su u Europi, Sjedinjenim Američkim Državama i Sjevernoj Africi, a u Europi se osobito opisuju varijante CTX-M-1 i CTX-M-15. Pored navedenih, u Španjolskoj, Portugalu i Velikoj Britaniji često se dokazuju i enzimi iz skupine CTX-M-9, osobito varijante CTX-M-9 i CTX-M-14. Skupina CTX-M-2 beta-laktamaza većinom je rasprostranjena u Južnoj Americi i Japanu, a u Kini su najčešće beta-laktamaze iz CTX-M-9 skupine (RAMOS i sur., 2020.).

U izolatima vrste *E. coli* izdvojenih iz domaćih životinja u Europi, najveću učestalost imaju varijante CTX-M-1. U peradi učestalost ovih enzima je 38 %, a potom ih slijede CTX-M-2 (8 %), CTX-M-14 (6 %) te CTX-M-15 varijante beta-laktamaza (1 %) (RAMOS i sur., 2020.).

#### **2.4.3.1. CTX-M beta-laktamaze u humanoj medicini**

CTX-M beta-laktamaze su dominantne ESBL u izolatima humanog porijekla u mnogim zemljama poput Velike Britanije, Italije, Španjolske, Grčke, Poljske, Bugarske, Rusije, Latvije, Brazila, Kine, Tajvana i drugih (BEDENIĆ i MEŠTROVIĆ, 2021.). Iako geografska rasprostranjenost može biti različita u ljudi su najčešće dokazane CTX-M-15 i CTX-M-14 varijante beta-laktamaza (RAMOS i sur., 2020.). U Francuskoj su najzastupljenije CTX-M-1 beta-laktamaze, dok u izolatima *E. coli* u Španjolskoj prevladavaju varijante CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-1 i CTX-M-9 (BEDENIĆ i MEŠTROVIĆ, 2021.). Brojna istraživanja u Južnoj Americi, Africi i Aziji potvrđuju dominaciju CTX-M-15 varijante beta-laktamaza (BEDENIĆ i MEŠTROVIĆ, 2021.).



Dominacija enzima iz CTX-M skupine u izolatima vrste *E. coli* u Hrvatskoj uočena je u ranim 2000-tim godinama kada zamjenjuju do tada najčešće opisivane TEM i SHV beta-laktamaze (LITERACKA i sur., 2009.). Njihovo širenje dokazano je u različitim dijelovima Hrvatske s dominacijom beta laktamaza iz skupine CTX-M-1, osobito varijante CTX-M-15 (KRILANOVIĆ i sur., 2020.; BEDENIĆ i MEŠTROVIĆ, 2021.).

U Bosni i Hercegovini, prema istraživanju iz 2015. godine, najzastupljenije su CTX-M-15 beta-laktamaze, a prvi put dokazane su i CTX-M-3, CTX-M-22 i CTX-M-28 varijante u urinarnim izolatima bolničkih i izvan bolničkih pacijenata (IBRAHIMAGIĆ i sur., 2015.).

#### **2.4.3.2. CTX-M beta-laktamaze u veterinarskoj medicini**

Globalno širenje CTX-M beta-laktamaza među izolatima bakterijske vrste *E. coli* uočeno je i u veterinarskoj medicini pa novija istraživanja opisuju CTX-M pozitivne izolate *E. coli* izdvojene iz domaćih životinja i kućnih ljubimaca. Osim toga, CTX-M pozitivni izolati izdvojeni su i iz hrane te otpadnih voda što ukazuje na velik broj rezervoara ovih enzima (BAJAJ i sur., 2016.).

U životinja su najčešće opisivane varijante CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32 i CTX-M-55 beta-laktamaza (RAMOS i sur., 2020.; CASTANHEIRA, 2021.). Općenito beta-laktamaze iz skupine CTX-M-1 najzastupljenije su u životinja, osobito varijante CTX-M-1 i CTX-M-15 (VALENTIN i sur., 2014.; GUNDRAN i sur., 2019.; RAMOS i sur., 2020.). U izolatima *E. coli* iz peradi najučestalija varijanta ovih enzima je CTX-M-1 što potvrđuju brojna provedena istraživanja (HUIJBERS i sur., 2014.; RAMOS i sur., 2020.; BALÁZS i sur., 2021.). Učestalost varijante CTX-M-15 je najveća u kućnih ljubimaca, te potom u goveda i svinja, dok se rjeđe opisuje kod peradi (RAMOS i sur., 2020.).

Podataka o zastupljenosti ESBL izolata u veterinarskoj medicini u Hrvatskoj je vrlo malo. Istraživanje iz 2014. godine prvi put opisuje CTX-M pozitivan izolat *E. coli*, izdvojen iz psa, koji je istovremeno tvorio CTX-M-15 beta-laktamazu i CMY-2 AmpC beta-laktamazu (BEDENIĆ i sur., 2015.). Nekoliko godina kasnije opisani su i prvi izolati bakterije *K. pneumoniae* izdvojeni iz pasa koji su istovremeno tvorili TEM i CTX-M beta-laktamaze (PINTARIĆ i sur., 2017.).

U Bosni i Hercegovini provedena su dva istraživanja na izolatima *E. coli* izdvojenih iz mesa i fecesa peradi. Istraživanje iz 2020. godine dokazalo je prisutnost skupina CTX-M-1, CTX-M-2 i CTX-M-9 beta-laktamaza u izolatima izdvojenih iz mesa peradi, a istraživanje iz 2021. godine, provedeno s obriscima kloake kokoši, potvrdilo je dominaciju CTX-M-1 skupine beta-laktamaza od kojih je trećina pripadala varijanti CTX-M-15 (HADŽIĆ- HASANOVIĆ i sur., 2020.; FETAHAGIĆ i sur., 2021.).

#### **2.4.4. OXA beta-laktamaze**

Beta-laktamaze OXA-skupine odgovorne su za rezistenciju na aminobenzil-peniciline (ampicilin) i prvu generaciju cefalosporina (cefalotin), a slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom (BUSH i sur., 1995.). Dobro hidroliziraju oksacilin i kloksacilin prema čemu su dobile naziv oksacilinaze (OXA, engl. *oxacillin hydrolysing*) (BUSH i sur., 1995.). Porodica OXA enzima danas predstavlja drugu prema veličini porodicu beta-laktamaza, a pojedine varijante OXA enzima mogu uzrokovati ESBL fenotip koji većinom podrazumijeva rezistenciju na ceftazidim (BUSH i JACOBY, 2010.).

#### **2.4.5. Ostale ESBL**

Većina beta-laktamaza proširenog spektra djelovanja derivat su TEM ili SHV beta-laktamaza ili se mogu svrstati u neku od novijih porodica ESBL. Međutim, opisani su enzimi s karakteristikama ESBL koji nisu srodni niti jednoj poznatoj skupini ESBL enzima (BRADFORD, 2001.).

Prvi takav enzim, rezistentan na djelovanje cefalosporina, a osjetljiv na klavulansku kiselinu, je PER-1 beta-laktamaza otkrivena u izolatu vrste *P. aeruginosa*, a kasnije i u drugih bakterija kao što su *Salmonella enterica* serovar Typhimurium i *A. baumannii*. Njoj srodan enzim, s 86 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu, je PER-2 beta laktamaza također dokazana kod sojeva *S. Typhimurium*. PER-1 i PER-2 beta-laktamaze su najčešći predstavnici PER skupine enzima, a osim kod pseudomonasa dokazani su i u bakterijskih vrsta *A. baumannii* i *Aeromonas* spp., kao i u različitim bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

GES skupini beta laktamaza pripada preko dvadeset varijanti GES enzima koji se razlikuju u aminokiselinskom slijedu zbog čega pokazuju različite sposobnosti hidrolize beta-laktama i različitu osjetljivost na inhibitore, a najčešće se opisuju kod vrsta *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (BEBRONE i sur., 2013.; CASTANHEIRA i sur., 2021.).

VEB-1 beta-laktamaza izolirana je iz bakterije *E. coli* u Vijetnamu, a potom i iz vrste *P. aeruginosa* na Tajlandu (BRADFORD, 2001.). Sljedeći enzimi, povezani s prethodnima i sličnih ESBL osobina, su CME-1 enzim izdvojen iz bakterijske vrste *Chryseobacterium meningosepticum*, TLA-1 enzim dokazan kod izolata bakterije *E. coli* u Meksiku, te slabije zastupljeni SFO-1enzim izdvojen iz izolata vrste *Serratia fonticola*, BES-1 otkriven u Brazilu i enzim BEL-1 otkriven u Belgiji (BRADFORD, 2001.; SHAIKH i sur., 2015.; CASTANHEIRA i sur., 2021.).

Navedene beta-laktamaze, osobito PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1 i TLA-1, pokazuju samo 40-50 % sličnosti u građi, a razlog su otpornosti na oksimino-cefalosporine (osobito ceftazidim) i aztreonam (BRADFORD, 2001.).

#### **2.4.6. AmpC beta-laktamaze**

Sve enterobakterije, osim vrsta *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, te vrsta iz rodova *Salmonella* i *Klebsiella*, posjeduju kromosomske AmpC beta-laktamaze (PHILIPPON i sur., 2002.). Njihova ekspresija je inducibilna, osim u vrsta *E. coli* i *Shigella* spp. u kojih je većinom konstitutivna i niske razine (LIVERMORE, 1995.).

AmpC beta-laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine druge i treće generacije te monobaktame (aztreonam), ali za razliku od ESBL, razgrađuju i cefamicine (cefoksitin) i nisu osjetljive na djelovanje inhibitora beta-laktamaza (BLACK i sur., 2005.).

Plazmidne AmpC beta-laktamaze nastale su prijenosom kromosomskih gena *ampC* na plazmid što je omogućilo prijenos gena između bakterija istih ili različitih vrsta (BEDENIĆ i sur., 2015.). Za razliku od kromosomskih, plazmidne AmpC beta-laktamaze nisu inducibilne (THOMSON, 2001.).

Prva plazmidna AmpC beta-laktamaza odgovorna za rezistenciju na peniciline, cefamicine, oksimino-cefalosporine i monobaktame otkrivena je krajem 80-ih godina u

bakteriji *K. pneumoniae*, a gen koji ju kodira konjugacijom se prenosio na vrstu *E. coli* (BAUERNFEIND i sur., 1989.). Enzim je, zbog svoje aktivnosti na cefamicine, nazvan CMY-1 i bolje ga inhibira sulbaktam nego klavulanska kiselina ili tazobaktam (PHILIPPON i sur., 2002.).

Do danas je poznato više različitih tipova ovih enzima kao što su MIR, CMY, BIL, FOX ili LAT, a najzastupljeniji je enzim CMY-2 (JACOBY i MUNOZ-PRICE, 2005.).

#### **2.4.7. Beta-laktamaze otporne na inhibitore beta-laktamaza**

Skupina beta-laktamaza otpornih na djelovanje inhibitora beta-laktamaza ne uzrokuje ESBL fenotip, ali se o njima, kao derivatima TEM ili SHV enzima, često raspravlja zajedno s ESBL (BRADFORD, 2001.).

Početakom 1990-ih godina otkrivene su beta-laktamaze otporne na djelovanje klavulanske kiseline, a sekvenciranjem je ustanovljeno da su srodne enzimima TEM-1 ili TEM-2 (BRADFORD, 2001.). Iako su prvotno nazvane inhibitor rezistentne TEM beta-laktamaze (IRT, engl. *inhibitor resistant TEM beta-lactamase*) naknadno su preimenovane (BRADFORD, 2001.). Budući da je većina inhibitor-rezistentnih beta-laktamaza derivat TEM-1 beta-laktamaze obilježavaju se kao TEM enzimi s odgovarajućim rednim brojem (CASTANHEIRA i sur., 2021.). Točkaste mutacije koje dovode do rezistencije na inhibitore javljaju se na nekoliko specifičnih mjesta unutar strukturnog gena za TEM enzim: metionin-69, serin-130, arginin-244, arginin-275 i asparagin-276. Čini se da ove mutacije, koje rezultiraju rezistencijom na klavulansku kiselinu i sulbaktam, dovode do smanjene sposobnosti hidrolize pojedinih antimikrobnih lijekova iz skupine penicilina i cefalosporina, kao što je cefalotin (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

Dokazano je najmanje 19 različitih vrsta inhibitor-rezistentnih TEM beta-laktamaza, a najčešće se nalaze u sojeva *E. coli*, a potom i u vrsta *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *P. mirabilis* i *Citrobacter freundii* (BRADFORD, 2001.).

Iako su inhibitor-rezistentni TEM enzimi rezistentni na djelovanje klavulanske kiseline i sulbaktama, osjetljivi su na djelovanje inhibitora tazobaktama i avibaktama (CASTANHEIRA i sur., 2021.).

## **2.5. Laboratorijska dijagnostika ESBL**

Prisutnost ESBL u nekom izolatu ne može se utvrditi uobičajenim metodama određivanja osjetljivosti izolata kao što je disk difuzijski postupak. Za pouzdano dokazivanje njihove prisutnosti u kliničkim izolatima primjenjuju se dodatni laboratorijski postupci.

Prema smjernicama Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (CLSI, engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) za prepoznavanje tvorbe ESBL kod vrsta *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* i *P. mirabilis* potrebno je provesti inicijalni probirni test pomoću disk difuzijskog postupka s dijagnostičkim diskovima cefpodoksima, ceftazidima, aztreonama, cefotaksima ili ceftriaksona. Istovremena upotreba više navedenih antibiotika povećava vjerojatnost detekcije tvorbe ESBL, a ukoliko se u rutinsko ispitivanje osjetljivosti izolata uključuje samo jedan od navedenih antibiotika, preporuka je ispitati osjetljivost na cefpodoksim jer ga podjednako hidroliziraju i TEM i SHV i CTX-M beta laktamaze (LIVERMORE i BROWN, 2001.; CLSI, 2018.). Ukoliko se dokaže smanjena osjetljivost na cefpodoksim ili neki od ostalih spomenutih antimikrobnih lijekova, za potvrdu tvorbe ESBL potrebno je provesti dodatne testove koji se mogu podijeliti na fenotipske i molekularne testove dokazivanja tvorbe ESBL.

### **2.5.1. Postupci fenotipske potvrde tvorbe ESBL**

Fenotipski potvrdni testovi temelje se na sinergijskom djelovanju cefalosporina treće generacije, kao što su ceftazidim i cefotaksim, i nekog inhibitora beta-laktamaza, najčešće klavulanske kiseline. Mogu se provesti na više načina, a uobičajeno se upotrebljavaju postupak kombiniranih diskova i postupak dvostrukog disk-sinergijskog testa (DDST).

#### **2.5.1.1. Postupak kombiniranih diskova**

Prema smjernicama CLSI-a nakon pozitivnog probirnog testa provodi se postupak kombiniranih diskova kao fenotipski potvrdni test za tvorbu ESBL. U tu svrhu koriste se dijagnostički diskovi ceftazidima i cefotaksima te diskovi istih antibiotika uz dodatak klavulanske kiseline. Klavulanska kiselina inhibira djelovanje ESBL te na taj način povećava osjetljivost pretraživanog izolata na cefalosporine. Prema kriterijima CLSI-a, povećanje zone

inhibicije od 5 mm i više, u korist diska koji sadrži klavulansku kiselinu, smatra se ESBL pozitivnim testom (CLSI, 2018.).

#### **2.5.1.2. Dvostruki disk-sinergijski test**

U rutinskom radu mikrobioloških laboratorija koristi se i dvostruki disk-sinergijski test. Prilikom izvođenja ovog postupka koriste se dijagnostički diskovi amoksisicilin-klavulanske kiseline te diskovi cefalosporina treće generacije (ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim).

Disk s amoksisicilin-klavulanskom kiselinom postavlja se u sredinu, a oko njega po jedan od cefalosporina treće generacije (ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim). Ukoliko izolat tvori ESBL, dolazi do širenja inhibicijske zone cefalosporina prema disku s klavulanskom kiselinom (THOMSON i SANDERS, 1992.).

#### **2.5.2. Postupci molekularne potvrde tvorbe ESBL**

Budući da fenotipski potvrdni testovi dokazuju samo tvori li ispitivani soj ESBL, razvijene su brojne molekularne metode koje, osim potvrde tvorbe ESBL, omogućuju i tipizaciju ESBL gena. Primjeri molekularnih metoda su oligotipizacija (engl. *oligotyping*), lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*), analiza duljine restrikcijskih odsječaka (PCR-RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction*), analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (PCR-SSCP, engl. *polymerase chain reaction single-strand conformational polymorphism*) (BRADFORD, 2001.).

Od navedenih metoda PCR je najčešći molekularni postupak za dokaz prisustva i identifikaciju beta-laktamaza.

### **3. OBRAZLOŽENJE TEME**

Bakterija *Escherichia coli* čini značajan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, no istovremeno je i jedan od najčešćih uzročnika različitih infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini. U liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom uobičajeno se primjenjuju beta-laktamski antibiotici, fluorokinoloni, aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini i nitrofurantoin. Međutim, prekomjerna i često neodgovarajuća pa i nepotrebna primjena antibiotika može rezultirati selekcijom sojeva rezistentnih na jedan ili više antimikrobnih lijekova.

Kod bakterije *E. coli* osobito je značajna stečena rezistencija na beta-laktamske antimikrobne lijekove koji se najčešće primjenjuju u liječenju zbog njihovog širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti. Najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame je tvorba enzima beta-laktamaza koji inaktiviraju beta-laktamske antimikrobne lijekove hidrolizom beta-laktamskog prstena. Osobiti značaj imaju beta-laktamaze proširenog spektra, enzimi koji razgrađuju peniciline, cefalosporine i monobaktame, ali ne i cefamicine i karbapeneme, a osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza, kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam. Ovi enzimi dijele se u tri velike porodice: TEM, SHV i CTX-M. Dugo vremena su TEM i SHV beta-laktamaze bile dominantne diljem svijeta, međutim situacija se drastično promijenila, i dominaciju su preuzeli enzimi iz CTX-M skupine. Danas su oni najrasprostranjenija skupina ESBL kod izolata humanog i životinjskog podrijetla.

Osim u humanoj medicini, pojava i širenje beta-laktamaza, pa tako i ESBL, zabilježena je i u veterinarskoj medicini. Bakterije koje tvore ESBL izdvojene su iz gotovo svih domaćih i nekih vrsta divljih životinja, iz njihovog neposrednog okoliša te iz proizvoda životinjskog porijekla. Stoga se životinje i njihovi proizvodi smatraju važnim rezervoarima ESBL pozitivnih bakterija koje predstavljaju prijeteći problem javnom zdravlju.

Mnoga istraživanja provedena u različitim državama ustanovila su porast broja multirezistentnih bakterija izdvojenih iz farmskih životinja i njihovih vlasnika. Naime, prilikom uzgoja životinja koje služe za prehranu ljudi često se, osim u terapijske svrhe, antimikrobni lijekovi koriste i u profilaksi te u svrhu poboljšanja rasta životinja što pogoduje selekciji i širenju rezistentnih izolata. Osim farmskih životinja, prijetnju javnom zdravlju predstavlja i rezistencija bakterija izdvojenih iz kućnih ljubimaca koji zbog bliskog kontakta s ljudima predstavljaju izvor multirezistentnih bakterija, pa i onih koje tvore ESBL.



Zbog bakterijske tvorbe beta-laktamaza neprestano se povećava učestalost infekcija uzrokovanih bakterijama otpornim na beta-laktamske antimikrobne lijekove, pa su mjere kontrole prilikom njihovog korištenja od velike važnosti u kontroli širenja ESBL pozitivnih sojeva. Činjenica da se geni koji kodiraju ESBL lako šire između bakterija iste, ali i različitih vrsta, predstavlja rastući problem i u humanoj i u veterinarskoj medicini. Stoga je pravovremeno prepoznavanje i dokaz rezistentnih sojeva od presudnog značenja prije primjene antimikrobnog lijeka. Osim toga, nužno je odrediti osjetljivost sojeva na antibiotike kako bi odabrali najučinkovitiji lijek.

U ovom istraživanju provest će se fenotipski potvrdni test za detekciju tvorbe ESBL kod izolata bakterije *E. coli* rezistentnih na cefotaksim izdvojenih iz fecesa peradi. Kod izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL disk difuzijskim postupkom ispitat ćemo osjetljivost na pojedine antimikrobne lijekove iz različitih skupina.

Nadalje, kod ESBL pozitivnih izolata istražiti će se prisutnost gena najčešće odgovornih za dokazanu fenotipsku rezistenciju (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* i *bla<sub>TEM</sub>*). Prisustvo svih gena bit će istraženo istovremeno u jednoj lančanoj reakciji polimerazom ('multipleks' PCR).

Kod izolata s dokazanim genom *bla<sub>CTX-M</sub>* ciljni odsječak gena bit će umnožen lančanom reakcijom polimerazom. Dobivenim produktima sekvenciranjem će se odrediti točan slijed nukleotida što će odrediti tip gena *bla<sub>CTX-M</sub>* i pripadnost enzima određenoj skupini.

Ovo istraživanje će dati uvid u pojavnost i zastupljenost izolata bakterije *E. coli* rezistentnih na cefotaksim izdvojenih iz fecesa kokoši s područja Bosne i Hercegovine gdje je trenutno vrlo malo dostupne literature slične tematike. Dokazom gena za rezistenciju (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* i *bla<sub>SHV</sub>*) ukazat ćemo na opasnost njihovog prijenosa na druge bakterijske vrste, ali i na opasnost prijenosa rezistentnih izolata sa životinje na čovjeka što predstavlja veliku prijetnju javnom zdravstvu.

Iz svega navedenog slijedi hipoteza ovog znanstvenog rada:

U izolatima *E. coli* iz fecesa peradi rezistentnih na cefotaksim bit će veća zastupljenost beta-laktamaze CTX-M-1 u odnosu na druge skupine CTX-M beta-laktamaza.

Ciljevi rada su:

1. fenotipski potvrditi tvorbu ESBL u arhiviranih izolata *E. coli* metodom kombiniranih diskova uz dodatak klavulanske kiseline
2. u fenotipski rezistentnih izolata dokazati prisustvo gena *bla*<sub>CTX-M</sub> te istražiti postoji li istovremena prisutnost gena *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>
3. u izolata pozitivnih na gen *bla*<sub>CTX-M</sub> odrediti kojem tipu CTX-M beta-laktamaze pripada.

## **4. MATERIJAL I METODE**

## **4.1. Uzorci**

Uzorci fecesa peradi prikupljeni s različitih peradarskih farmi diljem Bosne i Hercegovine u periodu od početka 2016. do kraja 2017. godine dostavljeni su u J.U. „Veterinarski Zavod“ Bihać na Odjel za epizootiologiju i zarazne bolesti u Laboratorij za invazijske bolesti, bolesti peradi, pčela i riba. Prikupljeni su zbog redovne rutinske pretrage na prisutnost bakterija iz roda *Salmonella* sukladno Pravilniku o ciljevima za smanjenje prisustva bakterija vrsta *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium* kod brojlera („Službeni glasnik BiH“, 102/12).

## **4.2. Probir izolata rezistentnih na cefotaksim**

Prikupljeni uzorci naciyepljeni su u tripton soja bujon (TSB) za predobogaćivanje s dodatkom cefotaksima u koncentraciji 1 mg/l, a potom na MacConkey agar s dodatkom cefotaksima u koncentraciji 1 mg/l (DIERIKX i sur., 2013). Naciyepljene podloge inkubirane su pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Na taj način izvršen je probir izolata rezistentnih na cefotaksim.

## **4.3. Odabir izolata *E. coli* rezistentnih na cefotaksim**

Istovremeno je uz probir izolata rezistentnih na cefotaksim izvršen odabir izolata koji su prema morfološkim, uzgojnim i biokemijskim osobinama odgovarali vrsti *E. coli*. U tu svrhu promatrao se rast i izgled kolonija na MacConkey agaru te se ispitala sposobnost tvorbe indola i oksidaze (MARKEY i sur., 2013.).

### **4.3.1. Rast i razgradnja laktoze na MacConkeyevom agaru**

MacConkey agar je selektivna i diferencijalna podloga za izdvajanje i razlikovanje bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* i drugih gram-negativnih bakterija. Kao inhibitore rasta gram-pozitivnih bakterija podloga sadrži žučne soli, a u svrhu razlikovanja laktoza-pozitivnih od laktoza-negativnih bakterija sadrži šećer laktozu i neutralno crvenilo kao

pH indikator. Bakterije koje razgrađuju laktozu stvaraju kisele metabolite koji snižavaju pH i mijenjaju boju podloge i kolonija u ružičasto.

Svi odabrani izolati naciyepljeni su na MacConkey agar (Condalab, Španjolska) i inkubirani 24 sata pri temperaturi od 37 °C. Vrsta *E. coli* razgrađuje laktozu pa na ovoj podlozi tvori kolonije ružičaste boje okružene zonom precipitacije žučnih soli.

#### **4.3.2. Određivanje sposobnosti tvorbe indola**

Sposobnost tvorbe indola određena je indolskim testom u kojem je korišten bujon s dodatkom triptofana (Condalab, Španjolska) i Kovačev reagens (Condalab, Španjolska) koji s indolom tvori kompleks i boji podlogu u ružičasto. U bujon su naciyepljene čiste 24-satne bakterijske kulture porasle na hranjivom agaru (Condalab, Španjolska). Nakon inkubacije na 37 °C tijekom 24 sata u bujon se dodalo nekoliko kapi Kovačevog reagensa. Ukoliko ispitivani izolat razgradnjom triptofana tvori indol pojavljuje se ružičasti prsten na površini inokuliranog bujona odnosno na mjestu stvaranja kompleksa između indola i Kovačevog reagensa. Za kontrolu određivanja sposobnosti tvorbe indola korišteni su referentni sojevi bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 (negativna kontrola) i *E. coli* ATCC 25922 (pozitivna kontrola).

#### **4.3.3. Određivanje sposobnosti tvorbe oksidaze**

Sposobnost tvorbe enzima citokrom-oksidaze određuje se komercijalnim diskovima (Oxidase Test Discs, Condalab, Španjolska) prema uputama proizvođača. U postupku su korištene čiste bakterijske kulture porasle na hranjivom agaru nakon 24-satne inkubacije pri temperaturi od 37 °C. Za kontrolu određivanja sposobnosti tvorbe oksidaze korišteni su referentni sojevi bakterija *P. aeruginosa* ATCC 27853 (pozitivna kontrola) i *E. coli* ATCC 25922 (negativna kontrola).

Svi izolati rezistentni na cefotaksim koji su prema osnovnim morfološkim, uzgojnim i biokemijskim karakteristikama odgovarali bakterijskoj vrsti *E. coli* (laktoza-pozitivni, indol-pozitivni, oksidaza-negativni) izabrani su za daljnje istraživanje i pohranjeni u tripton-soja bujon (Condalab, Španjolska) s dodatkom 20 % glicerola na temperaturu od -20 °C.

#### **4.4. Fenotipska potvrda tvorbe ESBL**

U svrhu dokaza tvorbe ESBL korišten je postupak kombiniranih diskova prema smjericama CLSI-a (CLSI, 2018.). Bakterijska suspenzija pripravljena je od nekoliko kolonija čiste 24-satne bakterijske kulture uzgojene na hranjivom agaru u sterilnoj fiziološkoj otopini NaCl-a (Roth, Njemačka) optičke gustoće 0,5 po McFarlandu koja je određena denzitometrom (DEN-1, Biosan, Latvija). Tako pripravljena suspenzija je sterilnim vatiranim štapićem nanesa na površinu Mueller-Hintonovog agara (Condalab, Španjolska) debljine 4 mm u tri smjera rotirajući Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm za 60 °C. Nakon sušenja podloge tijekom nekoliko minuta, pomoću sterilne pincete na površinu agara postavljeni su sljedeći diskovi s antimikrobnim lijekovima (Condalab, Španjolska): cefotaksim (CTX, 30 µg), ceftazidim (CAZ, 30 µg), cefotaksim/klavulanska kiselina (CTX/CV, 30/10 µg) i ceftazidim/klavulanska kiselina (CAZ/CV, 30/10 µg). Podloga je inkubirana 24 sata pri temperaturi od 37 °C u aerobnim uvjetima.

Nakon inkubacije uspoređene su zone inhibicije oko diskova cefotaksima i ceftazidima sa zonama oko diskova s istim antimikrobnim lijekovima uz dodatak klavulanske kiseline. Prema kriterijima CLSI-a, zona inhibicije veća za najmanje 5 mm oko diska s dodatkom klavulanske kiseline smatra se ESBL pozitivnim testom (CLSI, 2018.).

Za kontrolu provođenja kombiniranog testa korišteni su referentni sojevi bakterija *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL pozitivna kontrola) i *E. coli* ATCC 25922 (ESBL negativna kontrola).

Izolati kojima je fenotipski dokazana tvorba ESBL uključeni su u daljnje istraživanje.

#### **4.5. Biokemijska identifikacija vrste pomoću API 20E niza**

Identifikacija izolata kojima je fenotipski ustanovljena tvorba ESBL potvrđena je komercijalnim setom API 20E za biokemijsku identifikaciju bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* (bioMerieux, Francuska). Ovaj komercijalni biokemijski niz sastoji se od 20 epruvetica koje sadrže dehidrirane supstrate pomoću kojih se određuju biokemijske osobine pretraživanog bakterijskog izolata. Dodavanjem bakterijske suspenzije dolazi do rehidracije supstrata u epruveticama.

Bakterijska suspenzija pripravljena je iz čiste 24-satne bakterijske kulture uzgojene na hranjivom agaru. Jedna izolirana kolonija suspendirana je u sterilnoj fiziološkoj otopini priloženoj uz set (API NaCl 0,85 % Medium, bioMerieux, Francuska). Tako pripravljena bakterijska suspenzija dodana je u epruvetice biokemijskog niza prema uputama proizvođača. Cijeli set je inkubiran 24 sata pri temperaturi od 37 °C.

Nakon završene inkubacije prema uputi proizvođača su očitane dobivene reakcije i zabilježene na obrasce za rezultate priložene uz set. Potpuna identifikacija odrađena je uz pomoć računalnog programa (apiweb, bioMerieux, Francuska) u koji su unijeti dobiveni rezultati biokemijskog niza. Program na temelju unešenih rezultata daje podatke o bakterijskoj vrsti.

#### **4.6. Određivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom**

Osjetljivost izolata na antimikrobne lijekove određena je disk difuzijskim postupkom po Kirby-Baueru prema preporukama CLSI-a (CLSI, 2018.). Bakterijska suspenzija pripravljena je od nekoliko kolonija čiste 24-satne bakterijske kulture uzgojene na hranjivom agaru u sterilnoj fiziološkoj otopini NaCl-a (Roth, Njemačka) optičke gustoće 0,5 po McFarlandu koja je određena denzitometrom (DEN-1, Biosan, Latvija). Tako pripravljena suspenzija sterilnim vatiranim štapićem je nanosena na površinu Mueller-Hintonovog agara debljine 4 mm u tri smjera rotirajući Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm za 60 °C. Nakon sušenja podloge tijekom nekoliko minuta, sterilnom pincetom na površinu agara postavljeni su dijagnostički diskovi s antimikrobnim lijekovima te su podloge inkubirane 24 sata pri temperaturi od 37 °C u aerobnim uvjetima.

Određena je osjetljivost izolata na slijedeće antimikrobne lijekove: amoksisilin/klavulanska kiselina, cefoksitin, cefotaksim, ceftazidim, cefpodoksim, cefepim, meropenem, enrofloksacin, ciprofloksacin, gentamicin, sulfametaksazol/trimetoprim i tetraciklin. Na temelju izmjerenog promjera zone inhibicije rasta bakterijske kulture i prema CLSI kriterijima izolati su podijeljeni u skupine osjetljiv (S, engl. *susceptible*), umjereno osjetljiv (I, engl. *intermediate*) i otporan tj. rezistentan (R, engl. *resistant*) (CLSI, 2015.; CLSI

2018.). Popis antimikrobnih lijekova s oznakom diskova i količinom aktivnih tvari koje sadrže, naziv proizvođača te kriteriji za procjenu rezultata navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Antimikrobni lijekovi korišteni u disk difuzijskom postupku i kriteriji za procjenu rezultata

Antimikrobni lijek (oznaka)	Količina aktivne tvari (µg)	Promjer zone inhibicije (mm)			Proizvođač
		S	I	R	
Amoksicilin/ Klavulanska kiselina (AMC)	20/10	> 18	14-17	<13	Condalab, Španjolska
Cefoksitin (FOX)	30	> 18	15-17	<14	Condalab, Španjolska
Cefotaksim (CTX)	30	> 26	23-25	<22	Condalab, Španjolska
Ceftazidim (CAZ)	30	> 21	18-20	<17	Condalab, Španjolska
Cefpodoksim (CPD)	10	> 21	18-20	<17	Condalab, Španjolska
Cefepim (FEP)	30	> 25	19-24	<18	Condalab, Španjolska
Meropenem (MEM)	10	> 23	20-22	<19	Oxoid, UK
Enrofloksacin (ENR)	5	> 23	17-22	<16	Mast Group Ltd., UK
Ciprofloksacin (CIP)	5	> 21	16-20	<15	Oxoid, UK
Gentamicin (GM)	10	> 16	13-15	<12	Oxoid, UK
Sulfametaksazol/ Trimetoprim (SXT)	23,75/1,25	> 16	11-15	<10	Oxoid, UK
Tetraciklin (TE)	30	> 15	12-14	<11	Oxoid, UK

S - osjetljiv; I - umjereno osjetljiv; R – rezistentan

Prema MAGIORAKOS i sur. (2011.) navedeni antimikrobni lijekovi, osim cefpodoksima i enrofloksacina, mogu se svrstati u osam od 17 kategorija prema kojima se ispitivani izolat može definirati kao multirezistentan (MDR, engl. *multidrug-resistant*), opsežno ili prošireno rezistentan (XDR, engl. *extensively drug-resistant*) ili potpuno rezistentan (PDR, engl. *pandrug-resistant*). Klasifikacija upotrijebljenih antimikrobnih lijekova prema



kategorijama za procjenu multirezistencije prikazana je u tablici 3. Za potrebe ovog istraživanja u odgovarajuće kategorije smješteni su i cefpodoksim i enrofloksacin.

Multirezistentnim izolatima smatraju se oni izolati koji su rezistentni ili umjereno osjetljivi na najmanje jedan antimikrobni lijek iz tri različite kategorije. Opsežno rezistentni su izolati rezistentni ili umjereno osjetljivi na najmanje jedan antimikrobni lijek iz svih ili gotovo svih kategorija (na lijekove iz najviše dvije kategorije mogu biti osjetljivi). Potpuno rezistentni ili panrezistentni izolati su oni kod kojih je uočena rezistencija na sve antimikrobne lijekove iz svih kategorija (MAGIORAKOS i sur., 2011.).

Tablica 3. Klasifikacija antimikrobnih lijekova prema kategorijama za procjenu multirezistentnih izolata

<b>R. br.</b>	<b>Kategorije antimikrobnih lijekova</b>	<b>Antimikrobni lijek</b>
1.	Penicilini+Inhibitori beta-laktamaza	Amoksisilin/klavulanska kiselina
2.	Cefamicini	Cefoksitin
3.	Cefalosporini 3. i 4. generacije	Cefotaksim, Ceftazidim, Cefepim, Cefpodoksim
4.	Karbapenemi	Meropenem
5.	Fluorokinoloni	Ciprofloksacin, Enrofloksacin
6.	Aminoglikozidi	Gentamicin
7.	Inhibitori metabolizma folne kiseline	Sulfametoksazol/Trimetoprim
8.	Tetraciklini	Tetraciklin

## 4.7. Dokazivanje gena za ESBL lančanom reakcijom polimerazom

U izolata *E. coli* rezistentnih na cefotaksim kod kojih je fenotipskim potvrdnim testom dokazana tvorba ESBL lančanom reakcijom polimerazom istražena je prisutnost gena za rezistenciju *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> multipleks PCR tehnikom, odnosno u istoj PCR reakciji ispitana je prisutnost sva tri navedena gena.

### 4.7.1. Izdvajanje bakterijske DNA

Iz izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL izdvojena je DNA pomoću pripravka Chelex-100 (Bio-Rad, SAD). Korištene su svježe bakterijske kulture uzgojene na Columbia agaru (Mast Group, UK) pri temperaturi od 37 °C. Chelex-100 je pripravak u obliku praha kojeg je potrebno suspendirati u sterilnoj redestiliranoj vodi kako bi se dobila 2 %-tna otopina. Postupak pripreme otopine obuhvaća vaganje količine od 0,1 g pripravka Chelex-100 u sterilnu staklenu čašicu, dodavanje 5 ml sterilne redestilirane vode i sterilnog magneta te miješanje sadržaja na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Budući da se suspenzija Chelex-100 vrlo brzo taloži osobito je važno miješanjem održavati suspenziju homogenom i koristiti ju odmah nakon pripreme.

Postupak izdvajanja DNA:

1. Eppendorf epruvete volumena 2 ml označene su odgovarajućim brojevima i napunjene s 200 µl pripremljene 2 %-tne suspenzije Chelex-100 izravno iz čašice prilikom miješanja.
2. Bakteriološkom ušicom uzete su svježe kolonije s podloge i suspendirane u 2 %-tnoj suspenziji Chelex-100.
3. Suspenzija je dobro promiješana na tresilici tijekom desetak sekundi i kuhana 10 minuta pri 100 °C u termobloku TS-100 ThermoShaker (Bio-San, Latvija).
4. Nakon hlađenja, suspenzija je centrifugirana na 13000 okretaja u minuti pri 4 °C tijekom 10 minuta.

5. Supernatant s izdvojenom DNA prenesen je u nove sterilne Eppendorf epruvete označene odgovarajućim brojevima.
6. Izdvojena DNA pohranjena je na -20 °C do daljnje upotrebe.

#### 4.7.2. Dokazivanje gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>

Prisustvo gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> istraženo je istovremeno u jednoj lančanoj reakciji polimerazom ('multipleks' PCR) prema protokolu umnažanja lanaca DNK kojeg su opisali MONSTEIN i sur. (2007.).

Za dokaz gena *bla*<sub>CTX-M</sub> korištene su početnice koje umnažaju odsječak gena veličine 593 parova baza (pb), a koje su opisali PAGANI i sur. (2003.):

- CTX-MU1: ATGTGCAGYACCAGTAARGT i
- CTX-MU2: TGGGTRAARTARGTSACCAGA.

Za dokaz gena *bla*<sub>TEM</sub> korištene su početnice koje umnažaju odsječak gena veličine 445 pb, a koje su opisali MONSTEIN i sur. (2007.):

- TEM-F: TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA i
- TEM-R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT.

Za dokaz gena *bla*<sub>SHV</sub> korištene su početnice koje umnažaju odsječak gena veličine 865 pb, a koje su opisali BABINI i LIVERMORE (2000.):

- SHV-F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG i
- SHV-R: GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG.

Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA. Kao pozitivna kontrola korištena je DNA izolata oznake II-286/16 bakterije *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* za koju je prethodno dokazano da posjeduje sva tri istraživana gena.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20  $\mu$ l korištene su:

1. početnice za gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (po 1  $\mu$ l CTX-MU1 i CTX-MU2)
2. početnice za gen *bla*<sub>TEM</sub> (po 1  $\mu$ l za TEM-F i TEM-R)
3. početnice za gen *bla*<sub>SHV</sub> (po 1  $\mu$ l za SHV-F i SHV-R)
4. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taqpolimeraze i pufera (Roti-Pol Hot-TaqS Red-Mix, Carl Roth GmbH& Co. KG, Njemačka) (V= 10  $\mu$ l)
5. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) (V= 3  $\mu$ l)
6. bakterijska DNA razrijeđena destiliranom vodom 1:10 (V= 1  $\mu$ l).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem protokolu:

▪ početna denaturacija	95 °C, 120 s	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	60 °C, 30 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 120 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 600 s	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu. Postupak pripreme gela bio je slijedeći:

1. U tikvicu je odvagano 1 g agaroze (Sigma Aldrich, SAD).
2. Dodano je 100 ml TAE pufera koncentracije 1X (Tris Acetatni EDTA pufer).
3. Agarozna je otopljena zagrijavanjem na 100 °C i potom ohlađena na 50 °C.
4. U ohlađenu agaroznu otopinu dodana su 3  $\mu$ l boje za DNA (CondaSafe Stain, Condalab, Španjolska).

5. Otopina je izlivena u kalup s češljicom za jažice i kalup je ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi gel polimerizirao.
6. Polimerizirani gel odmah je upotrijebljen za elektroforezu.

Za izvođenje elektroforeze u gelu upotrijebljen je uređaj Cleaver Scientific Ltd, UK. Kadica uređaja bila je ispunjena TAE puferom koncentracije 1 X u kojeg je uronjen kalup s gelom tako da je dio gela s jažicama okrenut prema katodi. Svi uzorci su ukapani direktno u jažice u količini od 4  $\mu$ l. Za određivanje veličine proizvoda lančane reakcije polimerazom u prvu i zadnju jažicu ukapano je 3  $\mu$ l standardiziranog biljega (100 bp-DNA-Ladder equimolar, Carl Roth GmbH& Co. KG, Njemačka). Elektroforeza je trajala 50 min uz upotrebu istosmjerne struje napona 100 V.

Po završetku elektroforeze gel je pregledan, rezultati analizirani i snimljeni pomoću uređaja Gel Doc 200 (Bio-Rad, SAD) koji se sastoji od ultraljubičastog prosvjetlivača, kamere za snimanje gelova i kompjuterskog programa za obradu fotografije gela (Quantity One Basicanalysis software). Veličina umnoženog odsječka DNA određena je usporedbom dobivenog proizvoda sa standardiziranim biljegom (100 bp-DNA-Ladder equimolar, Carl Roth GmbH& Co. KG, Njemačka).

#### **4.8. Određivanje varijante CTX-M beta-laktamaze**

U izolata kod kojih je multipleks PCR-om dokazan gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, novom lančanom reakcijom polimerazom umnožen je odsječak gena veličine 948 parova baza s početnicama i prema protokolu kojeg su opisali AHMED i sur. (2007.):

- CTX-M-F2: CCAGAATAAGGAATCCCATG i
- CTX-M-R2: GCCGTCTAAGGCGATAAAC.

Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA. Kao pozitivna kontrola korištena je DNA izolata oznake II-286/16 bakterije *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* za koju je prethodno dokazano da posjeduje *bla*<sub>CTX-M</sub> gen.

U PCR reakciji, ukupnog volumena 20  $\mu$ l korištene su:

1. početnice za gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (po 1  $\mu$ l za CTX-M-F2 i CTX-M-R2)
2. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taqpolimeraze i pufera (Roti-Pol Hot-TaqS Red-Mix, Carl Roth GmbH& Co. KG, Njemačka) (V= 10  $\mu$ l)
3. sterilna destilirana voda (ultraPUREDistilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) (V= 7  $\mu$ l)
4. bakterijska DNA razrijeđena destiliranom vodom 1:10 (V= 1  $\mu$ l).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem protokolu:

▪ početna denaturacija	95 °C, 120 s	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	51 °C, 30 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 60 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 300 s	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu prema postupku opisanom kod dokazivanja gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> u potpoglavlju 4.7.2. Ostatak proizvoda pohranjen je do daljnje analize na temperaturu -20 °C.

#### 4.8.1. Pročišćavanje proizvoda lančane reakcije polimerazom

Prije sekvenciranja proizvodi lančane reakcije polimerazom pročišćeni su od neupotrijebljenih sastojaka reakcije pomoću komercijalnog kita (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Njemačka) koji sadrži:

- kolonice za pročišćavanje koje se sastoje od gornje epruvete s membranom i donje epruvete za ispiranje,

- pufer za vezanje DNA na membranu,
- pufer za ispiranje DNA,
- pufer za otpuštanje DNA s membrane i
- epruvete za prikupljanje DNA.

Postupak pročišćavanja proizvoda lančane reakcije polimerazom:

1. Pufer za vezanje DNA na membranu pomiješati u omjeru 1:4 s proizvodom lančane reakcije polimerazom.
2. Pipetom prenijeti otopinu u gornju epruvetu kolonice za pročišćavanje.
3. Centrifugirati kolonicu na 10 000 okretaja u minuti tijekom jedne minute i odbaciti sadržaj iz donje epruvete za ispiranje.
4. U gornju epruvetu dodati 650  $\mu$ l pufera za ispiranje DNA.
5. Centrifugirati kolonicu na 10 000 okretaja u minuti tijekom jedne minute i odbaciti sadržaj iz donje epruvete za ispiranje.
6. Ponovno centrifugirati kolonicu na 14 000 okretaja u minuti tijekom dvije do tri minute.
7. Premjestiti gornju epruvetu kolonice za pročišćavanje u epruvetu za prikupljanje DNA, a baciti donju epruvetu za ispiranje.
8. Dodati 50  $\mu$ l pufera za otpuštanje DNA s membrane.
9. Inkubirati kolonicu na sobnoj temperaturi tijekom jedne minute.
10. Centrifugirati kolonicu na 14 000 okretaja u minuti tijekom dvije minute.
11. Baciti gornju epruvetu s membranom. Pročišćena DNA, odnosno proizvod lančane reakcije polimerazom, nalazi se u epruveti za prikupljanje.

#### 4.8.2. Molekularna tipizacija gena *bla*<sub>CTX-M</sub>

Pročišćeni proizvodi lančane reakcije polimerazom poslani su u tvrtku Macrogen (Nizozemska) gdje je određen slijed nukleotida gena *bla*<sub>CTX-M</sub>. Pri tome su korištene iste početnice kao kod umnažanja odsječka gena *bla*<sub>CTX-M</sub> lančanom reakcijom polimerazom CTX-M-F2 i CTX-M-R2. Nakon dobivanja nukleotidnih sljedova kontrolirana je njihova kvaliteta i točnost provjerom svake pojedine baze u dobivenom elektroferogramu korištenjem računalnog programa Chromas 2.6.2.0 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija). Navedenim postupkom uspoređeni su sljedovi nukleotida sekvencirani s uzvodnom i nizvodnom početnicom za svaki PCR proizvod, što je rezultiralo dobivanjem jedne sekvence svakog pojedinog PCR proizvoda.

Dobiveni sljedovi nukleotida obrađeni su pomoću računalnih programa Bio Edit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (HALL, 1999) i MEGA 7.0 (DNASTAR, Madison, Wisconsin, SAD) i uspoređeni s bazom nukleotidnih sljedova gena GenBank koju održava Nacionalni Centar za Biotehnoške Informacije (NCBI) uz pomoć programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) koji pronalazi sljedove nukleotida najsličnije onom koji se ispituje.

#### 4.9. Statistička obrada podataka

Za usporedbu varijabli dobivenih ovim istraživanjem korišten je Fisherov egzaktni test.

Izračunat je udio (%) izolata rezistentnih na cefotaksim, udio izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL te udio izolata genotipski pozitivnih na tvorbu ESBL.

U izolata kod kojih je molekularno potvrđena prisutnost nekog od istraživanih gena izračunata je učestalost pojedinog gena.

Fisherovim egzaktnim testom provjereno je postojanje statistički značajnih razlika u pojavnosti pojedinih gena.

Prema rezultatima dobivenima disk difuzijskom metodom, izolati su podijeljeni u skupine osjetljiv (S), umjereno osjetljiv (I) i rezistentan (R). Uspoređivano je postojanje li statistički značajne razlike u osjetljivosti na pojedine antimikrobne tvari.



Za potrebe analize i prikaza podataka korišten je statistički program STATISTICA v.14.0. (Statistica, Tibco, 2020.). Rezultati statističke analize između učestalosti pojedinih gena smatrani su statistički značajnima ako je dobivena p vrijednost iznosila manje od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

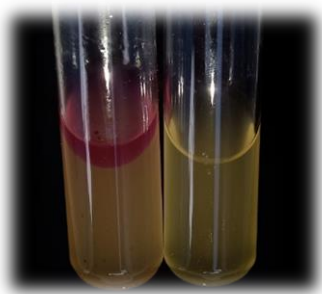
## **5. REZULTATI**

## 5.1. Porijeklo, uzgojne, morfološke i biokemijske osobine izolata

U razdoblju od početka 2016. do kraja 2017. godine u J.U. „Veterinarski Zavod“ Bihać, na Odjel za epizootiologiju i zarazne bolesti, u Laboratorij za invazijske bolesti, bolesti peradi, pčela i riba, dostavljeno je 498 uzoraka fecesa kokoši s različitih peradarskih farmi Bosne i Hercegovine. Nacjepeljivanjem uzoraka na podloge s dodatkom cefotaksima ukupno je izdvojeno 280 izolata iz 498 uzoraka (56,2 %), a koji su prema istovremeno istraživanim morfološkim, uzgojnim i biokemijskim osobinama odgovarali vrsti *E. coli*. Svi izolati porasli su na MacConkey agaru tvoreći kolonije ružičaste boje okružene zonom precipitacije žučnih soli (slika 1.). Kod svih izolata dokazana je tvorba indola (slika 2.), a niti jedan izolat nije tvorio enzim citokrom-oksidadzu (slika 3.).



Slika 1. Izgled kolonija vrste *E. coli* na MacConkey agaru (izolat 25F)



Slika 2. Određivanje sposobnosti tvorbe indola (lijevo – izolat *E. coli* 25F, desno – negativna kontrola).



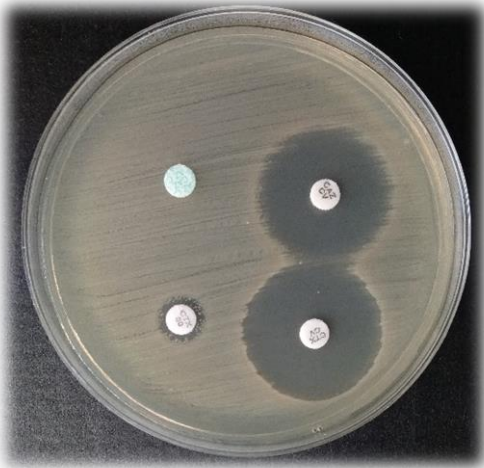
Slika 3. Određivanje sposobnosti tvorbe citokrom-oksidade (lijevo – izolat *E. coli* 25F, desno – pozitivna kontrola).

## 5.2. Rezultati fenotipske potvrde tvorbe ESBL

Za fenotipsku potvrdu tvorbe ESBL koristio se postupak kombiniranih diskova. U tu svrhu upotrijebljeni su diskovi cefotaksima i ceftazidima uz i bez dodatka klavulanske kiseline. Od ukupno 280 izolata rezistentnih na cefotaksim, njih 74 (26,4 %), imalo je za pet ili više mm veću zonu inhibicije oko diskova s dodatkom klavulanske kiseline u odnosu na diskove bez klavulanske kiseline što je označeno kao ESBL pozitivan rezultat. Od toga je 21 izolat (28,4 %) pokazao veću inhibicijsku zonu oko oba ispitivana antibiotika s dodatkom klavulanske kiseline. Ostala 53 izolata (71,6 %) pokazala su veću zonu inhibicije oko samo jednog od dva ispitivana antibiotika, i to 47 izolata (88,7 %) oko diska cefotaksima s dodatkom klavulanske kiseline, a šest izolata (11,3 %) oko diska ceftazidima s dodatkom klavulanske kiseline. Primjer fenotipske potvrde tvorbe ESBL postupkom kombiniranih diskova prikazan je na slici 4.

Učestalost izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL u ukupnom broju uzoraka fecesa bila je 14,9 %.

Izolati kod kojih je fenotipski potvrđena tvorba ESBL uključeni su u daljnje istraživanje.



Slika 4. Primjer fenotipske potvrde tvorbe ESBL postupkom kombiniranih diskova (izolat 17F).

### 5.3. Rezultati biokemijske identifikacije vrste pomoću API 20E niza

Svih 74 izolata identificirano je kao vrsta *E. coli* komercijalnim setom za identifikaciju bakterija API 20E. Biokemijske osobine pretraženih izolata prikazane su u tablici 4. Statistička vjerojatnost ispravne identifikacije kretala se od 99,5 % do 99,9 % ovisno o tome jesu li izolati tvorili enzim ornitin-dekarboksilazu i jesu li fermentirali saharozu. Sa sigurnošću od 99,9 % identificirano je 34 izolata (46,7 %) koji su tvorili ornitin-dekarboksilazu, a nisu fermentirali saharozu i pet izolata (6,7 %) koji nisu tvorili ornitin-dekarboksilazu, a fermentirali su saharozu. Sa sigurnošću od 99,8 % identificirano je 15 izolata (20,0 %) koji su dali negativan rezultat za obje navedene osobine, a 20 izolata (26,7 %) s pozitivnim rezultatom za obje osobine je identificirano sa sigurnošću od 99,5 %.

Na slici 5. prikazan je primjer API 20E niza nakon završene inkubacije i dodavanja reagensa.

Tablica 4. Biokemijske osobine izolata *E. coli* određenih API 20E nizom.

Supstrat	Biokemijska reakcija/enzim	% pozitivnih
2-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozid	beta-galaktozidaza	100
L-arginin	arginin-dihidrolaza	0
L-lizin	lizin-dekarboksilaza	100
L-ornitin	ornitin-dekarboksilaza	73,0
trinatrijev citrat	proizvodnja citrata	0
natrijev tiosulfat	proizvodnja H <sub>2</sub> S	0
urea	ureaza	0
L-triptofan	triptofan-deaminaza	0
L-triptofan	proizvodnja indola	100
natrijev piruvat	proizvodnja acetoina	0
želatina	želatinaza	0
D-glukoza	fermentacija glukoze	100
D-manitol	fermentacija manitola	100
inozitol	fermentacija inozitola	100
D-sorbitol	fermentacija sorbitola	100
L-ramnoza	fermentacija ramnoze	100
D-saharoza	fermentacija saharoze	33,8
D-melibioza	fermentacija melibioze	100
amigdalinalin	fermentacija amigdalinalina	0
L-arabinoza	fermentacija arabinoze	100



Sika 5. API 20E niz nakon inkubacije i dodavanja reagensa (ornitin-dekarboksilaza pozitivan i saharoza negativan izolat 62F).

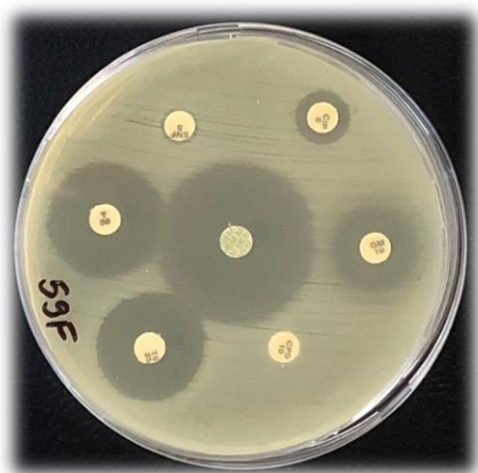
#### 5.4. Rezultati određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom

Disk difuzijskim postupkom ispitana je osjetljivost izolata na 12 antimikrobnih lijekova, a ukupni rezultati svih pretraženih izolata prikazani su u tablici 5.

Šezdeset tri izolata (85,1 %) bila su rezistentna ili umjereno osjetljiva na tri ili više antimikrobnih lijekova iz različitih kategorija prema čemu su procijenjeni kao multirezistentni izolati (MDR).

Fisherovim egzaktnim testom ( $p < 0,05$ ) ispitana je statistička značajnost razlike u osjetljivosti izolata na pojedine antimikrobne lijekove iz iste skupine. Značajna razlika u osjetljivosti izolata na cefalosporine dokazana je u postotku rezistentnih izolata na cefotaksim i cefpodoksim. U osjetljivosti izolata na pojedine fluorokinolone nije bilo statistički značajne razlike.

Primjer rezultata određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom prikazan je na slici 6.



Slika 6. Primjer rezultata određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom (izolat 59F).

Tablica 5. Ukupni rezultati određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk difuzijskim postupkom.

Antimikrobni lijek	S (%)	I (%)	R (%)
amoksicilin/klav. kis.	11 (14,9)	5 (6,7)	58 (78,4)
cefoksitin	34 (45,9)	4 (5,4)	36 (48,6)
cefotaksim	0 (0,0)	0 (0,0)	74 (100,0)
ceftazidim	27 (36,5)	7 (9,5)	40 (54,1)
cefpodoksim	0 (0,0)	0 (0,0)	74 (100,0)
cefepim	33 (44,6)	4 (5,4)	37 (50,0)
meropenem	74 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
enrofloksacin	38 (51,4)	12 (16,2)	24 (32,4)
ciprofloksacin	48 (64,9)	5 (6,8)	21 (28,4)
gentamicin	67 (90,5)	2 (2,7)	5 (6,8)
sulfametaksazol/trimetoprim	60 (81,1)	0 (0,0)	14 (18,9)
tetraciklin	36 (48,6)	0 (0,0)	38 (51,4)

S- osjetljiv; I- umjereno osjetljiv; R- rezistentan

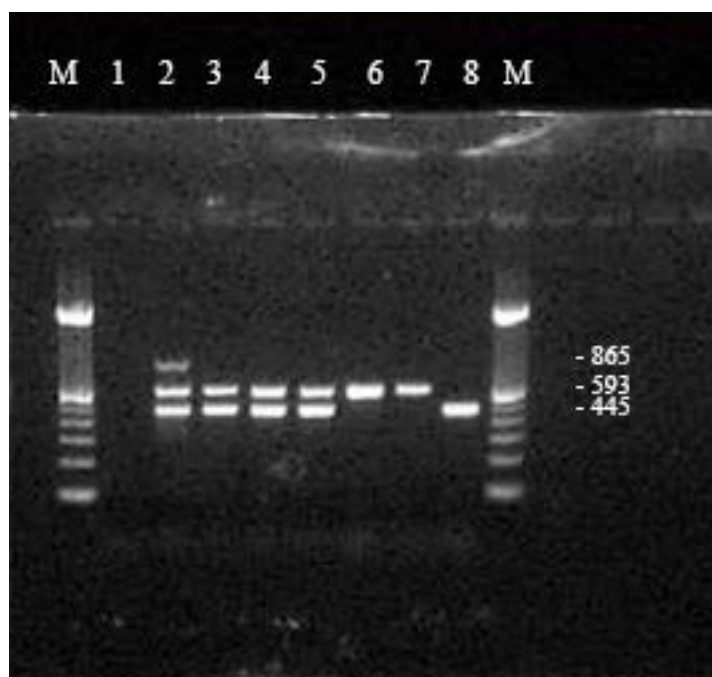
### 5.5. Rezultati dokazivanja gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>

Kod 74 izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL ispitana je prisutnost gena za rezistenciju *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> multipleks lančanom reakcijom polimerazom. U 54 izolata (73,0 %) dokazana je prisutnost jednog ili više gena. Gen *bla*<sub>CTX-M</sub> je dokazan u 33 izolata (61,1 %), gen *bla*<sub>TEM</sub> u 33 izolata (61,1 %) i gen *bla*<sub>SHV</sub> u jednom izolatu (1,9 %). Kod 13 izolata (24,1 %) dokazana je istovremena prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>. Niti u jednom izolatu nije dokazana istovremena prisutnost sva tri gena (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>).

U 20 (27,0 %) izolata nije dokazana prisutnost niti jednog od istraživanih gena (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>).



Primjer agaroznog gela nakon provedenog multipleks PCR-a i elektroforeze u svrhu dokazivanja gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub> prikazan je na slici 7.



Slika 7. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>SHV</sub>

M-100 pb DNA biljeg; 1- negativna kontrola; 2- pozitivna kontrola za gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (593 pb), *bla*<sub>TEM</sub> (445 pb) i *bla*<sub>SHV</sub> (865 pb); 3- izolat 13F; 4- izolat 14F; 5- izolat 15F; 6- izolat 16F; 7- izolat 17F; 8- izolat 33F.

## 5.6. Rezultati molekularne tipizacije gena *bla*<sub>CTX-M</sub>

Gen *bla*<sub>CTX-M</sub> je multipleks lančanom reakcijom polimerazom dokazan u 33 izolata te je novom lančanom reakcijom polimerazom, s početnicama CTX-M-F2 i CTX-M-R2, kod svih izolata umnožen odsječak navedenog gena veličine 948 pb. Sekvenciranjem dobivenih produkata određen je slijed nukleotida koji je uspoređen s bazom nukleotidnih sljedova GenBank. Usporedbom je u 32 izolata (97,0 %) ustanovljena 100%-tna podudarnost s nukleotidnim sljedom gena iz izolata *E. coli* označenog u NCBI bazi gena kodom MG029089.1. Navedeni slijed nukleotida odgovara slijedu nukleotida gena *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Kod jednog izolata

(3,0 %) ustanovljena je 100 %-tna podudarnost sa slijedom nukleotida u genu izolata *E. coli* u NCBI bazi označenog kodom MN540571.1, a koji odgovara genu *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

U tablici 6. prikazani su svi istraživani izolati, njihove oznake, profili rezistencije, rezultati kombiniranog testa te dokazani geni.

Tablica 6. Zastupljenost gena, profili rezistencije i rezultati kombiniranog testa izolata *E. coli*

R. br.	Oznaka izolata	Profil rezistencije	Rezultati komb.testa		<i>bla</i> <sub>ESBL</sub> geni
			CTX/CV	CAZ/CV	
1.	1F	CTX, CPD, FEP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
2.	2F	CTX, CPD, FEP, SXT,TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
3.	3F	CTX, CPD , FEP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
4.	4F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
5.	5F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
6.	6F	AMC, CTX, CPD, SXT,TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
7.	7F	AMC, CTX, CPD, FEP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
8.	8F	AMC, CTX, CAZ, CPD, ENR	+	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>
9.	9F	AMC, CTX, CPD, FEP, SXT	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
10.	10F	AMC, CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
11.	11F	AMC, CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
12.	12F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
13.	13F	AMC, CTX, CPD, FEP, SXT,TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
14.	14F	AMC, CTX, CPD, FEP, SXT,TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
15.	15F	AMC, CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
16.	16F	AMC, CTX, CAZ, CPD, FEP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
17.	17F	AMC, CTX, CAZ, CPD, FEP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>

(nastavlja se)

Tablica 6. Zastupljenost gena, profili rezistencije i rezultati kombiniranog testa izolata *E. coli* (nastavak)

R. br.	Oznaka izolata	Profil rezistencije	Rezultati komb.testa		<i>bla</i> <sub>ESBL</sub> geni
			CTX/CV	CAZ/CV	
18.	18F	AMC, CTX, CAZ, CPD, FEP, ENR, CIP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
19.	19F	AMC, CTX, CPD, FEP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
20.	20F	AMC, CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, SXT, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
21.	21F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
22.	22F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
23.	23F	AMC, CTX, CPD, FEP	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
24.	24F	AMC, CTX, CPD, FEP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
25.	3A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP, GM, SXT, TE	-	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
26.	4A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP	-	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
27.	5A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP, TE	-	+	-
28.	6A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP	-	+	-
29.	7A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP	-	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
30.	8A	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, FEP, ENR, CIP	-	+	-
31.	25F	CTX, CPD, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
32.	26F	CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, SXT	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
33.	27F	CTX, CPD, FEP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
34.	28F	CTX, CPD, FEP, ENR, CIP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
35.	29F	CTX, CPD, FEP	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
36.	30F	CTX, CAZ, CPD, FEP, ENR, CIP, TE	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>

(nastavlja se)

Tablica 6. Zastupljenost gena, profili rezistencije i rezultati kombiniranog testa izolata *E. coli* (nastavak)

R. br.	Oznaka izolata	Profil rezistencije	Rezultati komb.testa		<i>bla</i> <sub>ESBL</sub> geni
			CTX/CV	CAZ/CV	
37.	31F	CTX, CPD, FEP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
38.	32F	AMC, CTX, CPD, ENR, CIP, TE	+	+	-
39.	33F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR	+	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
40.	34F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	+	-
41.	35F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
42.	36F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
43.	37F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
44.	38F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, GM, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
45.	39F	FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
46.	40F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
47.	41F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, GM, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
48.	42F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
49.	43F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
50.	44F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
51.	45F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
52.	46F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
53.	47F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
54.	48F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-

(nastavlja se)

Tablica 6. Zastupljenost gena, profili rezistencije i rezultati kombiniranog testa izolata *E. coli* (nastavak)

R. br.	Oznaka izolata	Profil rezistencije	Rezultati komb.testa		<i>bla</i> <sub>ESBL</sub> geni
			CTX/CV	CAZ/CV	
55.	49F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
56.	50F	FOX, CTX, CPD	+	-	-
57.	51F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
58.	52F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, GM	+	-	-
59.	53F	AMC, FOX, CTX, CPD, ENR, CIP, GM, SXT, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
60.	54F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP, TE	+	-	-
61.	55F	FOX, CTX, CPD	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
62.	56F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, TE	+	-	-
63.	57F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
64.	58F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
65.	59F	AMC, CTX, CPD, FEP, ENR, CIP	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
66.	60F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP	+	-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
67.	61F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, ENR, CIP	+	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
68.	62F	CTX, CAZ, CPD	+	-	-
69.	63F	CTX, CPD, FEP	+	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
70.	64F	AMC, CTX, CPD	+	-	-
71.	65F	CTX, CPD, TE	+	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
72.	66F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD	+	-	-
73.	67F	AMC, CTX, CAZ, CPD, TE	+	-	-
74.	68F	AMC, FOX, CTX, CAZ, CPD, TE	+	-	-

## **6. RASPRAVA**

U Bosni i Hercegovini je vrlo malo dostupne literature u veterinarskoj medicini o pojavnosti i zastupljenosti izolata bakterijske vrste *E. coli* koji tvore ESBL. U protekle dvije godine provedena su dva istraživanja na izolatima *E. coli* izdvojenih iz mesa i fecesa peradi. Istraživanje iz 2020. godine dokazalo je prisutnost CTX-M beta-laktamaza proširenog spektra iz skupina CTX-M-1, CTX-M-2 i CTX-M-9 u izolatima *E. coli* izdvojenih iz mesa peradi, dok je istraživanje iz 2021. godine, provedeno s obriscima kloake kokoši, utvrdilo da su najzastupljenije beta-laktamaze proširenog spektra u izolatima *E. coli* bile iz skupine CTX-M-1, a trećina ih je pripadala varijanti CTX-M-15 (HADŽIĆ- HASANOVIĆ i sur., 2020.; FETAHAGIĆ i sur., 2021.).

U humanoj medicini u Bosni i Hercegovini dostupno je nešto više podataka, ali uglavnom o detekciji tvorbe ESBL kod urinarnih izolata bakterijske vrste *E. coli*. Novija istraživanja istaknula su da većina izolata tvori enzime iz skupine CTX-M beta-laktamaza. Prema istraživanju iz 2015. godine provedenom na različitim enterobakterijama najzastupljenije su bile CTX-M-15 beta-laktamaze, a prvi put su dokazane i varijante CTX-M-3, CTX-M-22 i CTX-M-28 u urinarnim izolatima bolničkih i izvan bolničkih pacijenata (IBRAHIMAGIĆ i sur., 2015.). Istraživanje iz 2017. potvrdilo je dominaciju CTX-M beta-laktamaza koje su dokazane u izolatima gram-negativnih bakterija iz različitih uzoraka bolničkih i izvan bolničkih pacijenta. U izolatima *E. coli* najzastupljenije su bile beta-laktamaze iz skupine CTX-M-1, osobito varijanta CTX-M-15, a potom i varijante CTX-M-1 i CTX-M-3 (IBRAHIMAGIĆ i sur., 2017.).

U ovom istraživanju pretraženi su uzorci fecesa kokoši prikupljeni s različitih peradarskih farmi diljem Bosne i Hercegovine u periodu od početka 2016. do kraja 2017. godine. Nacjepeljivanjem uzoraka na podloge s dodatkom cefotaksima ukupno je izdvojeno 280 izolata *E. coli* iz 498 uzoraka fecesa (56,2 %). Postotak izdvojenih izolata rezistentnih na cefotaksim veći je u odnosu na istraživanje koje su proveli FETAHAGIĆ i sur. (2021.) u kojem je iz 108 obrisaka kloake kokoši s 25 peradarskih farmi iz Zeničko-dobojskog kantona izdvojeno 27 izolata *E. coli* (25,0 %) rezistentnih na cefotaksim. Ovako velika razlika posljedica je upotrebe različitih koncentracija cefotaksima u podlozi koja je korištena za selekciju rezistentnih izolata. U ovom istraživanju je za izdvajanje izolata iz fecesa upotrijebljena niža koncentracija cefotaksima u podlozi (1 mg/l) od one upotrijebljene u istraživanju od FETAHAGIĆ i sur. (2021.) gdje je ta koncentracija bila 3 mg/l. Naime, ovo istraživanje je započelo znatno ranije pa se za selekciju izolata koristila niža koncentracija cefotaksima prema

smjernicama dotadašnjih istraživanja. Novija istraživanja ukazuju na to da je MacConkey agar s višom koncentracijom cefotaksima pouzdaniji za izdvajanje izolata *E. coli* čija je rezistencija na cefotaksim posljedica tvorbe ESBL, a ne AmpC beta-laktamaza. Rast AmpC izolata inhibiran je dodatkom cefotaksima u koncentraciji od 4 µg/ml, ali njihov rast neće biti inhibiran dodatkom 2 µg/ml cefotaksima (JACOB i sur., 2020.). Iz toga se može zaključiti da je koncentracija cefotaksima od 1 mg/l upotrijebljena u ovom istraživanju bila preniska za selekciju samo onih izolata koji tvore ESBL i da je tako niska koncentracija razlog malog postotka izolata kod kojih je fenotipskim testom potvrđena tvorba ESBL (26,4 %). Stoga, gledajući udio izolata kod kojih je fenotipskim testom potvrđena tvorba ESBL u ukupnom broju uzoraka, nema velike razlike između ovog istraživanja i istraživanja od FETAHAGIĆ i sur. (2021.). U ovom istraživanju je taj udio 14,9 % i nešto je manji od udjela u spomenutom istraživanju (19,4 %). Sličnu zastupljenost izolata *E. coli* koji tvore ESBL izdvojenih iz kokoši (17,5 %) bilježi i istraživanje provedeno u Ugandi (KAKOOZA i sur., 2021.), dok istraživanja provedena u drugim državama bilježe nešto veće udjele ESBL pozitivnih izolata u ukupnom broju pretraženih uzoraka. Tako je učestalost izolata *E. coli* koji tvore ESBL iz kokoši s odabranih farmi na Filipinima iznosila 66,7 % (GUNDRAN i sur., 2019.), dok je u istraživanju provedenom u Sloveniji ona iznosila 22,0 % (ZORMAN ROJS i sur., 2019.). Razlog nešto niže učestalosti ESBL pozitivnih izolata u ovom istraživanju u odnosu na ostala istraživanja može biti i zbog pojave lažno negativnih rezultata fenotipskog testa za detekciju tvorbe ESBL zbog moguće istovremene tvorbe ESBL i AmpC beta-laktamaza u izolatima. Izolati *E. coli* koji istovremeno tvore ESBL i AmpC beta-laktamaze su u velikom porastu i posljednjih godina dobivaju značajniju pažnju (ZORMAN ROJS i sur., 2019.). Njihova istovremena prisutnost u izolatima otežava dokazivanje ESBL fenotipa jer su AmpC beta-laktamaze rezistentne na klavulansku kiselinu pa otežavaju sinergistički učinak klavulanske kiseline i cefalosporina na ESBL (RAWAT i NAIR, 2010.; KAUR i sur., 2016.). Kada isti bakterijski soj istovremeno tvori i ESBL i AmpC beta-laktamaze, AmpC beta-laktamaze poništavaju inhibiciju ESBL klavulanskom kiselinom i na taj način prikrivaju tvorbu ESBL (YILMAZ i sur. 2013.). Nadalje, klavulanska kiselina inducira tvorbu visokih razina AmpC beta-laktamaza što može dovesti do lažno negativnih rezultata u dokazivanju ESBL (KAUR i sur., 2016.). Iz navedenih razloga, u slučaju sumnje na ESBL, kada je fenotipski potvrdni test negativan svakako je preporuka ispitati prisutnost AmpC beta-laktamaza, jer se u suprotnom u tom izolatu može previdjeti tvorba ESBL (RAWAT i NAIR, 2010.).



U ovom istraživanju lančanom reakcijom polimerazom u 54 od 74 (73,0 %) izolata *E. coli* dokazana je prisutnost jednog ili više gena odgovornih za rezistenciju na cefalosporine treće generacije. Od toga, gen *bla*<sub>CTX-M</sub> je dokazan u 33 izolata (61,1 %), gen *bla*<sub>TEM</sub> u 33 izolata (61,1 %) i gen *bla*<sub>SHV</sub> u samo jednom izolatu (1,9 %). To odgovara dosadašnjim istraživanjima koja su ustanovila da su u izolatima iz peradi najzastupljenije beta-laktamaze iz skupina CTX-M i TEM. Prema KHOSHBAKHT i sur. (2016.) najzastupljenije beta-laktamaze u izolatima iz kokoši bile su CTX-M beta-laktamaze (60,3 %) iza kojih slijede TEM beta-laktamaze (37,7 %). U istraživanju koje su proveli GUNDRAN i sur. (2019.) u izolatima *E. coli* iz kokoši najzastupljenije su bile beta-laktamaze iz CTX-M-1 skupine (72,5 %), a pored gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, dokazani su i geni *bla*<sub>TEM</sub> (58,0 %). Za razliku od spomenutih istraživanja, ovo istraživanje pokazalo je jednaku zastupljenost CTX-M i TEM beta-laktamaza što dovodi do zaključka da do kraja 2017. godine, do kada su prikupljeni uzorci, CTX-M beta-laktamaze još uvijek nisu preuzele dominaciju u izolatima iz peradi na području Bosne i Hercegovine. Veća zastupljenost CTX-M beta-laktamaza u uzorcima porijeklom od kokoši uočena je kasnije u izolatima izdvojenim iz obrisaka kloaka prikupljenih krajem 2019. godine. Tada je kod 21 od 27 (77,8 %) pretraženih izolata dokazana prisutnost gena za ESBL i svi su nosili gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, a njih 14 (66,7 %) istovremeno je uz *bla*<sub>CTX-M</sub> posjedovalo i gen *bla*<sub>TEM</sub> (FETAHAGIĆ i sur., 2021.). U ovom istraživanju istovremena prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub> uočena je kod 13 od 54 izolata (24,1 %) koja su molekularno bila pozitivna na prisutnost gena. Prema drugim istraživanjima to je najčešća kombinacija istovremeno prisutnih ESBL gena. GUNDRAN i sur. su u istraživanju iz 2019. godine imali 33,3 % izolata u kojima je dokazana istovremena prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>, te 21,7 % izolata koji su uz dva navedena gena posjedovali i treći, *bla*<sub>SHV</sub> gen. U istraživanju provedenom u Koreji istovremena prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub> dokazana je u 57,1 % izolata *E. coli* izdvojenih iz kokoši bez prisutnosti gena *bla*<sub>SHV</sub> (SEO i LEE, 2021.).

Molekularnom tipizacijom gena *bla*<sub>CTX-M</sub> ustanovljeno je da gen *bla*<sub>CTX-M</sub> u 32 od 33 izolata (97,0 %) odgovara genu *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, a u jednom izolatu (3,0 %) genu *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Prema istraživanjima, to su dvije najčešće varijante CTX-M enzima odgovorne za rezistenciju na cefalosporine treće generacije na području Europe, s time da varijanta CTX-M-15 prevladava u izolatima humanog porijekla i rijeđe je zabilježena u izolatima iz peradi, a nešto češće u izolatima iz kućnih ljubimaca. Varijanta beta laktamaze CTX-M-1 široko je rasprostranjena među izolatima porijeklom iz peradi i ostalih životinja koje se uzgajaju za proizvodnju hrane (RAMOS i sur., 2020.). Ipak, prema istraživanju provedenom na području Bosne i Hercegovine

s izolatima iz obrisaka kloaka kokoši prikupljenim krajem 2019. godine, čak trećina dokazanih CTX-M enzima pripadala je varijanti CTX-M-15 zbog čega su autori upozorili na mogući prijenos izolata s ljudi na životinje, ali i obrnuto (FETAHAGIĆ i sur., 2021.).

Kod 20 izolata (27,0 %) fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL lančanom reakcijom polimerazom nije dokazan niti jedan od tri pretraživana gena. Mogući razlog tome je da navedeni izolati posjeduju neki od rjeđe zastupljenih gena koji mogu uzrokovati rezistenciju na cefalosporine treće generacije, a koji nisu dokazivani u ovom istraživanju. Nadalje, opisani su i izolati koji su tvorili AmpC beta-laktamaze, a kod kojih je postupak kombiniranih diskova za detekciju tvorbe ESBL dao lažno pozitivan rezultat (ROBBERTS i sur., 2009.). Naime, iako su fenotipski potvrdni testovi vrlo osjetljivi i specifični, ponekad nisu dovoljno pouzdani te mogu dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate (RAWAT i NAIR, 2010). Lažno pozitivni rezultati prilikom fenotipskog dokazivanja tvorbe ESBL mogu nastati zbog hiperprodukcije beta-laktamaza uskog spektra djelovanja u kombinaciji sa smanjenom propusnosti bakterijske stijenke (CASTANHEIRA i sur., 2021.). Sličan postotak izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL, a bez dokazanih CTX-M, TEM i SHV gena za rezistenciju zabilježili su i FETAHAGIĆ i sur. (2021.) sa šest negativnih od 27 pretraženih fenotipski pozitivnih izolata (22,2 %).

U ovom istraživanju, u izolata fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL, disk difuzijskim postupkom istražena je i osjetljivost na dvanaest antimikrobnih lijekova iz različitih skupina. Na temelju dobivenih rezultata, izolati su razvrstani u skupine osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan. Svi izolati su, s obzirom na selektivni način izdvajanja iz fecesa, očekivano bili rezistentni na cefotaksim. Također, svi izolati (100,0 %) bili su rezistentni na cefpodoksime. U Bosni i Hercegovini već je zabilježen visok postotak izolata rezistentnih na cefpodoksime u istraživanju provedenom na uzorcima kože kokoši gdje je među 29 izolata *E. coli*, fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL, njih 28 (96,5 %) bilo rezistentno na ceftazidim (HADŽIĆ-HASANOVIĆ i sur., 2020.). Navedeno istraživanje nije provelo selekciju izolata iz uzoraka uz dodatak cefotaksima u podloge nego je ispitivanje osjetljivosti provedeno na svim izolatima *E. coli* koji su postupkom kombiniranih diskova fenotipski bili pozitivni na tvorbu ESBL. Stoga je izolata rezistentnih na cefotaksim bilo nešto manje (93,1 %).

U ovom istraživanju, na ceftazidim je bilo osjetljivo 27 izolata (36,5 %), a umjereno osjetljivo njih sedam (9,5 %). Većina njih, 26 (96,3 %) osjetljivih i tri (42,9 %) umjereno osjetljivih, bilo je pozitivno na gen *bla*<sub>CTX-M</sub>. Takav rezultat je očekivan jer CTX-M beta-laktamaze imaju niži afinitet za ceftazidim od cefotaksima pa često ne uzrokuju rezistenciju na

taj antibiotik. Među izolatima rezistentnim na ceftazidim, kojih je bilo 40 (54,1 %), njih samo četiri (10,0 %) imalo je gen *bla*<sub>CTX-M</sub> od čega su njih dva istovremeno imala i gen *bla*<sub>TEM</sub> koji je vjerojatno značajnije pridonio rezistenciji na taj antibiotik. To potvrđuje i činjenica da je čak 18 (45,0 %) izolata rezistentnih na ceftazidim imalo samo *bla*<sub>TEM</sub> gen. Jedan izolat imao je *bla*<sub>SHV</sub> gen koji također može biti uzrok rezistencije na ceftazidim. Kod preostalih 17 (42,5 %) izolata rezistentnih na ceftazidim nije dokazan niti jedan od istraživanih gena. Kod takvih izolata vjerojatni uzrok rezistencije je neka od brojnih beta-laktamaza nesrodnih enzimima SHV, TEM i CTX-M skupina, ali sličnog proširenog spektra djelovanja, kao što su primjerice enzimi iz OXA, PER, VEB, CME i TLA skupina. Osim njih, AmpC beta-laktamaze proširenog spektra dobro hidroliziraju ceftazidim i mogu uzrokovati rezistenciju na taj antibiotik.

Slično se može uočiti i kod osjetljivosti na cefoksitin koji pripada cefamicinima, odnosno drugoj generaciji cefalosporina, a na kojeg ne djeluju ESBL. Od 34 izolata (45,9 %) osjetljivih na cefoksitin kod njih 33 (97,1 %) dokazana je prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub>, a kod jednog gen *bla*<sub>SHV</sub>. Trinaest izolata (38,2 %) istovremeno je nosilo gene *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>. Kod preostalih 36 izolata (48,6 %) rezistentnih i četiri (5,4 %) umjereno osjetljiva na cefoksitin postoji opravdana sumnja da tvore AmpC beta-laktamaze na čije je djelovanje cefoksitin osjetljiv. Tom zaključku u prilog ide i to da je većina izolata rezistentnih na cefoksitin (33/36; 91,7 %) istovremeno rezistentna i na ceftazidim. Naime, kod enterobakterija je rezistencija na cefoksitin značajan pokazatelj prisutnosti AmpC beta-laktamaza, ali se na taj način njihova tvorba u izolatima ne može pouzdano potvrditi. Rezistenciju na cefoksitin, osim AmpC beta-laktamaza, mogu uzrokovati i drugi mehanizmi rezistencije kao što je smanjenje propusnosti bakterijske stijenke (BRADFORD, 2001.; YILMAZ i sur. 2013.; RIZI i sur., 2020.).

Na cefepim je bilo rezistentno 37 izolata (50,0 %), od kojih je kod njih 31 (83,8 %) dokazana prisutnost gena *bla*<sub>CTX-M</sub>. Od toga, njih 12 (38,7 %) je istovremeno imalo prisutna dva gena odgovorna za rezistenciju, *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>. Kod tri izolata (8,1 %) rezistentnih na cefepim dokazan je samo gen *bla*<sub>TEM</sub>. Kod preostala tri izolata rezistentna na cefepim nisu dokazani ispitivani geni. Ukupno 33 izolata bila su osjetljiva na cefepim (44,6 %). Od toga je kod njih 17 (51,5 %) dokazan gen *bla*<sub>TEM</sub>, a preostalih 16 (48,5 %) nije imalo niti jedan od ispitivanih gena.

Iz analize rezultata osjetljivosti dobivenih za cefoksitin, ceftazidim i cefepim vidljivo je da je kod svih izolata *E. coli* fenotipski pozitivnih na tvorbu ESBL, a koji su bili osjetljivi na cefoksitin, dokazana prisutnost jednog ili više ESBL gena, kao i u gotovo svih izolata koji su

bili rezistentni na cefepim. Takav fenotip odgovara tvorbi ESBL. S druge strane, u gotovo polovini izolata *E. coli* rezistentnih na cefoksitin, a istovremeno osjetljivih na cefepim, nije dokazan niti jedan od istraživanih gena, što ukazuje na moguću prisutnost AmpC beta-laktamaza kao uzroka rezistencije na cefoksitin. To potvrđuje i podatak kako je cefepim pouzdaniji antimikrobni lijek u dokazivanju ESBL kod izolata koji istovremeno tvore i AmpC beta-laktamaze, jer je minimalno osjetljiv na visoku razinu tvorbe AmpC beta-laktamaza (KAUR i sur., 2016.).

U istraživanje je uključeno i ispitivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove koji ne pripadaju skupini cefalosporina, a svi se, osim cefpodoksima i enrofloksacina, mogu svrstati u osam od 17 kategorija antimikrobnih lijekova prema kojima se enterobakterije mogu procijeniti kao multirezistentne (MDR), prošireno rezistentne (XDR) ili potpuno rezistentne (PDR) (MAGIORAKOS i sur., 2011.). Za potrebe ovog istraživanja u odgovarajuće kategorije smješteni su i cefpodoksim i enrofloksacin. Obzirom na broj kategorija antimikrobnih lijekova korištenih u ovom radu, istraživani izolati se nisu mogli procijeniti kao opsežno ili potpuno rezistentni. Za 63 izolata (85,1 %) ustanovljen je multirezistentni fenotip odnosno rezistencija na tri ili više antimikrobnih lijekova iz različitih kategorija, što je uobičajena osobina za izolate koji tvore ESBL ili AmpC beta-laktamaze (DIERIX i sur., 2013.). Sličan rezultat zabilježen je u istraživanju autora HUSSAIN i sur. (2019.) u kojem je 78,5 % izolata *E. coli* iz peradi, a koji su tvorili ESBL, bilo multirezistentno te u istraživanju autora SEO i LEE (2021.) u kojem je 45 od 51 izolata (88,2 %) *E. coli* iz fecesa i prašine s peradarskih farmi rezistentnih na cefotaksim bilo multirezistentno. U istraživanju provedenom u Bosni i Hercegovini na izolatima iz uzoraka mesa kokoši svi izolati (100,0 %) fenotipski pozitivni na tvorbu ESBL bili su i multirezistentni. Autori objašnjavaju tako visok postotak multirezistentnih izolata kao moguću posljedicu kontaminacije uzoraka tijekom manipulacije lešinama u klaonicama i tijekom rukovanja mesom (HADŽIĆ- HASANOVIĆ i sur., 2020.).

Najveći broj izolata bio je rezistentan na amoksicilin s klavulanskom kiselinom, njih 58 (78,4 %), što nije bilo očekivano s obzirom na to da klavulanska kiselina inhibira djelovanje beta-laktamaza proširenog spektra (GNIADKOWSKY, 2001.). Međutim, takav rezultat govori u prilog pretpostavci da dio istraživanih izolata tvori AmpC beta-laktamaze, enzime koji nisu osjetljivi na djelovanje klavulanske kiseline (BLACK i sur., 2005.). Pretpostavku potkrjepljuje i daljnja analiza dobivenih rezultata prema kojoj je vidljivo da od 20 izolata, kod kojih nije dokazana prisutnost niti jednog od istraživanih gena, njih 17 (85,0 %) je bilo rezistentno na

amoksicilin s klavulanskom kiselinom, dok su dva bila umjereno osjetljiva (10,0 %) i jedan osjetljiv (5,0 %). Osim toga, svih 20 izolata je bilo rezistentno ili umjereno osjetljivo i na cefoksitin i ceftazidim koji su također dobri supstrati za AmpC beta-laktamaze.

Na tetraciklin je bilo rezistentno nešto više od polovine izolata (38/74; 51,4 %), što je iznenađujuće s obzirom na opažanja zabilježena u istraživanjima provedenim u drugim državama gdje je postotak izolata rezistentnih na tetraciklin preko 70,0 % pa čak i 100,0 % (JAHANTIGH i sur., 2020.; BHARDWAJ i sur., 2021.; KOJU i sur., 2022.). Navedena istraživanja navode kako su tetraciklini najčešće korišteni antimikrobni lijekovi u liječenju i kontroli raznih bolesti peradi pa je rezultat toga pojava i širenje velikog broja rezistentnih izolata. To navodi na zaključak da u Bosni i Hercegovini tetraciklini nisu u širokoj primjeni u peradarstvu što se odražava i na nižem broju izolata rezistentnih na tetraciklin izdvojenih iz kokoši.

Među izolatima uključenim u ovo istraživanje nije bilo statistički značajne razlike u rezistenciji na ispitivane fluorokinolone, enrofloksacin i ciprofloksacin. Nešto više izolata bilo je rezistentno na enrofloksacin, njih 24 (32,4 %), u odnosu na ciprofloksacin na kojeg je bio rezistentan 21 izolat (28,4 %). Istovremena rezistencija na fluorokinolone dokazana je u 20 izolata (27,0 %). Dobiveni rezultati nešto su niži usporedimo li ih s istraživanjem provedenim u Bosni i Hercegovini u kojem je rezistencija na ciprofloksacin dokazana u 29,6 % izolata *E. coli* iz obrisaka kloaka kokoši (FETAHAGIĆ i sur., 2021.). Rezistencija na fluorokinolone nije iznenađujuća, jer se geni odgovorni za njihovu rezistenciju često nalaze na plazmidima zajedno s ESBL genima (TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ i sur. 2012). Druge države bilježe znatno više postotke izolata rezistentnih na fluorokinolone. GUNDRAN i sur. (2019.) uočili su 88,4 % izolata *E. coli* izdvojenih iz kokoši rezistentnih na ciprofloksacin. U Indiji je zabilježeno 94,0 % izolata *E. coli* iz obrisaka kloaka kokoši rezistentnih na ciprofloksacin i levofloksacin (BHARDWAJ i sur., 2021.), a BALÁZS i sur. (2021.) bilježe čak 100 % izolata *E. coli* iz fecesa peradi rezistentnih na ciprofloksacin.

Najmanje izolata u ovom istraživanju bilo je rezistentno na sulfametaksazol/trimetoprim (14/74; 18,9 %) i gentamicin (5/74; 6,8 %). Nešto veću rezistenciju izolata na sulfametaksazol/trimetoprim i gentamicin dokazali su BALÁZS i sur. (2021.) s 35,9 % odnosno 12,8 % rezistentnih izolata *E. coli* iz fecesa peradi. U istraživanju od FETAHAGIĆ i sur. (2021.) zabilježeno je 7,4 % izolata iz obrisaka kloaka kokoši koji su uz ESBL fenotip bili rezistentni na gentamicin što se podudara s rezultatom dobivenim u ovom istraživanju.

U ovom istraživanju niti jedan izolat nije bio rezistentan na meropenem što je u podudarnosti s brojnim drugim istraživanjima koja nisu dokazala prisutnost rezistencije na karbapeneme u izolata *E. coli* iz peradi (BALAZS i sur., 2021.; BHARDWAJ i sur., 2021.; FETAHAGIĆ i sur., 2021.). U današnje vrijeme karbapenem rezistentni izolati imaju veliku važnost i nalaze se na listi izolata koji ugrožavaju ljudsko zdravlje i zbog kojih je potrebno razviti nove antibiotike, a koju je 2017. godine izdala Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organization*). Nažalost, pojedina istraživanja bilježe pojavu karbapenem rezistentnih izolata i kod peradi. Istraživanje iz 2020. godine u Koreji dokazalo je rezistenciju na karbapeneme u 3,9 % izolata *E. coli* u peradi kod kojih su istovremeno dokazane i CTX-M beta-laktamaze, što potvrđuje i novije istraživanje u Maleziji gdje je u dva izolata (1,0 %) *E. coli* u uzorcima fecesa peradi pored ESBL enzima dokazana i istovremena prisutnost gena *bla<sub>NDM</sub>* odgovornog za tvorbu karbapenemaza (SEO i LEE, 2021.; CHAI i sur., 2022.).

## **7. ZAKLJUČCI**

1. Koncentracija cefotaksima od 1 mg/l dodanog u podloge nije dovoljno visoka za selekciju izolata vrste *Escherichia coli* čija je rezistencija na cefotaksim posljedica tvorbe ESBL, a ne tvorbe AmpC.
2. U 54 izolata izdvojenih iz 498 uzoraka fecesa kokoši (10,8 %) dokazan je najmanje jedan od tri pretraživana gena odgovornih za ESBL fenotip pa se takvi izolati smatraju potencijalnim izvorom gena za rezistenciju i njihovo širenje predstavlja prijetnju javnom zdravlju.
3. Većina dokazanih *bla*<sub>CTX-M</sub> gena (32/33; 97,0 %) pripada varijanti gena *bla*<sub>CTX-M-1</sub> što upućuje na zaključak da ovi izolati nisu uzročnici infekcija kod ljudi na području Bosne i Hercegovine jer je kod humanih izolata najzastupljenija varijanta gena *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.
4. Od 74 pretraživana izolata njih 63 (85,1 %) je bilo multirezistentno što je vjerojatno posljedica pretjerane i neprimjerene upotrebe različitih antimikrobnih lijekova u peradarstvu.



## **8. LITERATURA**

- AHMED, A. M., Y. MOTOI, M. SATO, A. MARUYAMA, H. WATANABE, Y. FUKUMOTO, T. SHIMAMOTO (2007): Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6686-6690.
- AMBLER, R. P. (1980): The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc.* 289, 321-331.
- AMBLER, R. P., A. F. COULSON, J. M. FRERE, J.M. GHUYSEN, B. JORIS, M. FORSMAN, R. C. LEVESQUE, G. TIRABY, S. G. WALEY (1991): A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 276, 269-270.
- ANDRAŠEVIĆ, S., M. VRANIĆ-LADAVAC, A. TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ (2009): Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki Glas.* 29, 171–176.
- BABINI, G. S., D. M. LIVERMORE (2000): Are SHV  $\beta$ -Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*?. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2230-2230.
- BAJAJ, P., S. S. NAMBRAM, S. V. JUGSHARAN (2016): *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamases: What really matters. *Front. Microbiol.* 7, 1-14.
- BALÁZS, B., J. BÁLINT-NAGY, Z. TÓTH, F. NAGY, S. KÁROLYI, I. TURCSÁNYI, A. BISTYAK, A. KÁLMÁN, R. SÁRKŐZY, G. KARDOS (2021): Occurrence of *Escherichia coli* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in food producing animals. *Acta. Vet. Hung.* 69, 211-215.
- BAUERNFEIND, A., Y. CHONG, S. SCHWEIGHART (1989): Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* 17, 316–321.
- BAUERNFEIND, A., H. GRIMM, S. SCHWEIGHART (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 18, 294–298.
- BEBRONE, C., P. BOGAERTS, H. DELBRUCK, S. BENNINK, M. KUPPER, R. REZENDE DE CASTRO, Y. GLUPCZYNSKI, K. M. HOFFMAN (2013): GES-18, a New Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 Residues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 396-401.

BEDENIĆ, B. (2004):  $\beta$ -LAKTAMAZE U LABORATORIJU I NJIHOVA ULOGA U REZISTENCIJI I. DIO: Evolucija bakterijske rezistencije uzrokovane  $\beta$ -laktamazama. Liječ. Vjesn. 126, 314-324.

BEDENIĆ, B., S. SARDELIĆ, M. LADAVAC (2015): Multirezistentne bakterije. Acta. Med. Croat. 69, 211-216.

BEDENIĆ, B., T. MEŠTROVIĆ (2021): Mechanisms of Resistance in Gram-Negative Urinary Pathogens: From Country-Specific Molecular Insights to Global Clinical Relevance. Diagnostics. 11, 800.

BHARDWAJ, K., S. SHENOY M., S. BALIGA, B. UNNIKRISHNAN, B. SHANTHARAM BALIGA, V. K. SHETTY (2021): Characterization of antibiotic resistant phenotypes and linked genes of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from healthy broiler chickens, Karnataka, India. Poultry Science 100, 1-5.

BLACK, A., E. SMITH MOLAND, K. S. THOMSON (2005): AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC-lactamases. J. Clin. Microbiol. 43, 3110-3113.

BRADFORD, P. A., Y. YANG, D. SAHM, I. GROPE, D. GARDOVSKA, G. STORCH (1998): CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1980-1984.

BRADFORD, P. A. (2001): Extended spectrum beta-lactamases in 21st century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933-951.

BUSH, K. (1989): Characterization of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 259-263.

BUSH, K., G. A. JACOBY, A. A. MEDEIROS (1995): A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211-1233.

BUSH, K., G. JACOBY (2010): Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 969-976.

CASTANHEIRA, M., P. J. SIMNER, P. A. BRADFORD (2021): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist.* 16, 1-21.

CHAI, M. H., M. Z. SUKIMAN, N. JASMY, N. A. ZULKIFLY, N. A. S. MOHD YUSOF, N. M. MOHAMAD, S. M. Z. ARIFFIN, M. F. GHAZALI (2022): Molecular Detection and Antibioqram of ESBL-producing Carbapenem Resistant *Escherichia coli* from Rabbit, Swine, and Poultry in Malaysia. *Trop. Animal Sci. J.* 45, 16-23.

CLSI (2015): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2018): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eighth edition. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

DATTA, N., P. KONTOMICHALOU (1965): Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 208, 239–244.

DIERIKX, C. M., J. A. VAN DER GOOT, H. E. SMITH, A. KANT, D. J. MEVIUS (2013): Presence of ESBL/AmpC-Producing *Escherichia coli* in the Broiler Production Pyramid: A Descriptive Study. *PLOS ONE.* 8, 1-8.

DOI, Y., A. IOVLEVA, R. A. BONOMO (2017): The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J. Travel. Med.* 24, 44-51.

DUTOUR C., R. BONNET, H. MARCHANDIN, M. BOYER, C. CHANAL, D. SIROT, J. SIROT (2002): CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -Lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 534-537.

FETAHAGIĆ, M., A. IBRAHIMAGIĆ, S. UZUNOVIĆ, N. BEADER, V. ELVEDI-GAŠPAROVIĆ, J. LUXNER, M. GLADAN, B. BEDENIĆ (2021.): Detection and characterisation of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase produced by *Escherichia coli* isolates found at poultry farms in Bosnia and Herzegovina. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 72, 305-314.

GNIADKOWSKI, M. (2001): Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 597-608.

GNIADKOWSKI, M. (2008): Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 11-32.

GIGUÈRE, S., J. F. PRESCOTT, P. M. DOWLING (2013): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th Edition, Wiley Blackwell.

GUNDRAN, R. S., P. A. CARDENIO, M. A. VILLANUEVA, F. B. SISON, C. C. BENIGNO, K. KREASUKON, D. PICHPOL, V. PUNYAPORNWITHAYA (2019): Prevalence and distribution of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Vet. Res.* 15, 1-8.

HADŽIĆ-HASANOVIĆ, V., A. JERKOVIĆ-MUJKIĆ, E. HASANOVIĆ, A. BAČIĆ, M. HUKIĆ (2020): Phenotypic and genotypic detection of ESBL-producing *E. coli* isolates from chicken skin in Bosnia and Herzegovina. *Med. Glasnik. Zenica.* 17, 308- 315.

HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41, 95-98.

HUIJBERS, P. M. C., E. A. M. GRAAT, A. P. J. HAENEN, M. G. VAN SANTEN, A. VAN ESSEN-ZANDBERGEN, D. J. MEVIUS, E. VAN DUIJKEREN, A. H. A. M. VAN HOEK (2014): Extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors, and molecular characteristics. *J. Antimicrob. Chemoter.* 69, 2669-2675.

HUJER A. M., K. M. HUJER, R. A. BONOMO (2001): Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1547, 37-50.

HUSSAIN, A., S. SHAIK, A. RANJAN, A. SURESH, N. SARKER, T. SEMMLER, L. H. WIELER, M. ALAM, H. WATANABE, D. CHAKRAVORTTY, N. AHMED (2019): Genomic and Functional Characterization of Poultry *Escherichia coli* From India Revealed Diverse Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Lineages With Shared Virulence Profiles. *Front. Microbiol.* 10, 1-12.

IBRAHIMAGIĆ, A., B. BEDENIĆ, F. KAMBEROVIĆ, S. UZUNOVIĆ (2015): High prevalence of CTX-M-15 and first report of CTX-M-3, CTX-M-22, CTX-M-28, and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings. *J. Infect. Chemoter.* 21, 363-369.

IBRAHIMAGIĆ, A., S. UZUNOVIĆ, B. BEDENIĆ, (2017): Prevalence of coexistence genes and clonal spread of ESBL-producing isolates causing hospital- and community-acquired infections in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *J. Health Sci.* 7, 80-90.

JACOB, M. E., S. KEELARA, A. AIDARA-KANE, J. R. MATHEU ALVAREZ, P. J. FEDORKA-CRAY (2020): Optimizing a Screening Protocol for Potential Extended-Spectrum-Lactamase *Escherichia coli* on MacConkey Agar for Use in a Global Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 58, 1-9.

JACOBY, G. A., L. S. MUNOZ-PRICE (2005): The new  $\beta$ -lactamases. *N. Engl. J. Med.* 352, 380-391.

JAHANTIGH, M., K. SAMADI, R. E. DIZAJI, S. SALARI (2020): Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Vet. Res.* 16, 1-6.

JANG, J., H. G. HUR, M. J. SADOWSKY, M. N. BYAPPANAHALLI, T. YAN, S. ISHII (2017): Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J. Appl. Microbiol.* 123, 570-581.

KAKOOZA, S., D. MUNYIIRWA, P. SSAJJAKAMBWE, E. KAYAGA, D. S. TAYEBWA, D. NDOBOLI, L. BASEMERA, E. NABATTA, M. A. TUMWEBAZE, J. BALIGWAMUNSI KANEENE (2021): Epidemiological Dynamics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase or AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Screened in Apparently Healthy Chickens in Uganda. *Hindawi Sci.* 2021, 1-6.

KAUR, J., G. MAHAJAN, K. CHAND, SHEVANI, S. CHOPRA (2016): Enhancing Phenotypic Detection of ESBL in AmpC co-producers by using Cefepime and Tazobactam. *J. Clin. Diagnostic Res.* 10, 5-8.

KHOSHBAKHT, R., S. SEIFI, M. RAEISI (2016): Antibiotic susceptibility and high prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Iranian broilers. *Revue Méd. Vét.* 167, 133-137.

KLIEBE, C., B. NIES, J. F. MAYER, R. M. TOLXDORFF-NEUZLING, B. WIEDEMAN (1985): Evolution of plasmid encoded resistance to broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 302-307.

KOJU, P., R. SHRESTHA, A. SHRESTHA, S. TAMRAKAR, A. RAI, P. SHRESTHA, S. K. MADHUP, N. KATUWAL, A. SHRESTHA, A. SHRESTHA, S. SHRESTHA, S. K. C., P. KARKI, P. TAMANG, P. THEKKUR, S. S. SHRESTHA (2022): Antimicrobial Resistance in *E. coli* Isolated from Chicken Cecum Samples and Factors Contributing to Antimicrobial Resistance in Nepal. *Trop. Med. Infect. Dis.* 7, 1-13.

KOUTSIANOS D., L. V. ATHANASIOU, D. MOSSIALOS, G. FRANZO, M. CECCHINATO, K. C. KOUTOULIS (2022): Investigation of Serotype Prevalence of *Escherichia coli* Strains isolated from Layer Poultry in Greece and Interactions with Other Infectious Agents. *Vet. Sci.* 9, 1-14.

KRILANOVIĆ, M., M. TOMIĆ-PARADŽIĆ, T. MEŠTROVIĆ, N. BEADER, Z. HERLJEVIĆ, R. CONZEMIUS, I. BARIŠIĆ, J. VRANEŠ, V. ELVEĐI-GAŠPAROVIĆ, B. BEDENIĆ (2020): Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid diversity in urinary isolates of *Escherichia coli* in Croatia: a nation-wide, multicentric, retrospective study. *Folia Microbiol. (Praha)* 65, 649-667.

LITERACKA, E., B. BEDENIĆ, A. BARANIAK, J. FIETT, M. TONKIĆ, I. JAJIĆ-BENČIĆ, M. GNIADKOWSKI (2009): *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in *Escherichia coli* strains from Croatian hospitals are located in new (*bla*<sub>CTX-M-3a</sub>) and widely spread (*bla*<sub>CTX-M-3a</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) genetic structures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1630-1635.

LIU, B., A. FUREVI, A. V. PEREPELOV, X. GUO, H. CAO, Q. WANG, P. R. REEVES, Y. A. KNIREL, L. WANG, G. WIDMALM (2020): Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 655-683.

LIVERMORE, D. M. (1995):  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.

LIVERMORE, D. M., D. F. J. BROWN (2001): Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemoter.* 48, 59-64.

MAGIORAKOS, A. P., A. SRINIVASAN, R. B. CAREY, Y. CARMELI, M. E. FALAGAS, C. G. GISKE, S. HARBARTH, J. F. HINDLER, G. KAHLMETER, B. OLSSON-LILJEQUIST, D. L. PATERSON, L. B. RICE, J. STELLING, M. J. STRUELENS, A. VATOPOULOS, J. T. WEBER, D. L. MONNET (2011): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268-281.

MARKEY, B., F. LEONARD, M. ARCHAMBAULT, A. CULLINANE, D. MAGUIRE (2013): *Clinical veterinary microbiology*, 2nd ed., Elsevier Health Sciences. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto. 239-255.

MEDEIROS, A. A. (1997): Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generation of  $\beta$ -lactams antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 32, 19-45.

MONSTEIN, H. J., A. OSTHOLM-BALKHED, M. V. NILSSON, M. NILSSON, K. DORNBUSCH, L. E. NILSSON (2007): Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS.* 115, 1400-1408.

MOULIN-SCHOULEUR, M., M. RÉPÉRANT, S. LAURENT, A. BRÉE, S. MIGNON-GRASTEAU, P. GERMON, D. RASSCHAERT, C. SCHOULER (2007): Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3366-3376.

MUGNIER, P., P. DUBROUS, I. CASIN, G. ARLET, E. COLLATZ (1996): A TEM-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 40, 2488-2493.

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija i mikologija. Veterinarski fakultet Zagrebu i Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb.



- PAGANI, L., E. DELL'AMICO, R. MIGLIAVACCA, M. M. D'ANDREA, E. GIACOBONE, G. AMICOSANTE, E. ROMERO, G. M. ROSSOLINI (2003): Multiple CTX-M-type Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4264-4269.
- PATTERSON, D. L., R. A. BONOMO (2005): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update. *Clin. Microbiol.* 18, 657-686.
- PHILIPPON A., G. ARLET, G. A. JACOBY (2002): Plasmid-Determined AmpC-Type- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1-11.
- PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs. Book of Abstracts of the 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 5-7 October. Zagreb, Hrvatska. str. 56-56.
- POIREL, L., M. GNIADKOWSKI, P. NORDMANN (2002): Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemoter.* 50, 1031-1034.
- QUEENAN, A. M., K. BUSH (2007): Carbapenemases: the versatile- $\beta$ -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440-458.
- RAMOS, S., V. SILVA, M. L. ENES DAPKEVICIUS, M. CANICA, M. T. TEJEDOR-JUNCO, G. IGREJAS, P. POETA (2020): *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) production. *Animals.* 10, 1-15.
- RUSSO, T. A., J. R. JOHNSON (2000): Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Inf. Dis.* 181, 1753-1754.
- RAWAT, D., D. NAIR (2010): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J. Global Inf. Dis.* 2, 263-274.

RIZI, K. S., A. MOSAVAT, M. YOUSSEFI, S. A. JAMEHDAR, K. GHAZVINI, H. SAFDARI, Y. AMINI, H. FARSIANI (2020): High prevalence of bla<sub>CMY</sub> AmpC beta-lactamase in ESBL co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* clinical isolates in the northeast of Iran. J. Global Antimicrob. Res. 22, 477-482.

ROBBERTS, F. J. L., P. C. KOHNER, R. PATEL (2009): Unreliable Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Detection in the Presence of Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli* Clinical Isolates. J. Clin. Microbiol. 47, 358-361.

SAMAHA- KFOURY, J. N., G. F. ARAY (2003): Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. BMJ 327, 1209-1213.

SEO, K. W., Y. J. LEE (2021): The occurrence of CTX-M-producing *E. coli* in the broiler parent stock in Korea. Poultry Science 100, 1008-1015.

SHAH, A. A., F. HASAN, S. AHMED, A. HAMEED (2004): Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs): Characterization, Epidemiology and Detection. Crit. Rev. Microbiol. 30, 25-32.

SHAIKH, S., F. JAMALE, S. SHAKIL, S. MOHD, D. RIZVI, M. A. KAMAL (2015): Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J. Biol. Sci. 22, 90-101.

SOUGAKOFF, W., S. GOUSSARD, P. COURVALIN (1988): The TEM-3 -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. FEMS Microbiol. Lett. 56, 343-348.

ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ, S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada. Zagreb.

TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ, A., M. JELIĆ, M. GUŽVINEC, I. BUTIĆ, S. BUKOVSKI (2012): Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj-uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. Infektološki glasnik. 32, 45-52.

THOMSON, K. S., C. C. SANDERS (1992): Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 1877-1882.

THOMSON, K. S. (2001): Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 333-336.

VALENTIN, L., H. SHARP, K. HILLE, U. SEIBT, J. FISCHER, Y. PFEIFER, G. BRENNER MICHAEL, S. NICKEL, J. SCHMIEDEL, L.FALGENHAUER, A. FRIESE, R. BAUERFEIND, U. ROESLER, C. IMIRZALIOGLU, T. CHAKRABORTY, R. HELMUTH, G. VALENZA, G. WERNER, S. SCHWARZ, B. GUERRA, B. APPEL, L. KREIENBROCK, A. KÄSBOHRER (2014): Subgrouping of ESBL-producing *E. coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 805-816.

VILA, J., E. SÁEZ-LÓPEZ, J. R. JOHNSON, U. RÖMLING, U. DOBRINDT, R. CANTÓN, C. G. GISKE, T. NAAS, A. CARATTOLI, M. MARTÍNEZ-MEDINA, J. BOSCH, P. RETAMAR, J. RODRÍGUEZ-BAÑO, F. BAQUERO, S. M. SOTO (2016): *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 437-463.

WU, P. J., K. SHANNON K, I. PHILLIPS (1994): Effect of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 494-498.

YILMAZ, N., N. AGUS, E. BOZCAL, A. UZEL (2013): Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Indian J. Med. Microbiol.* 31, 53-59.

ZORMAN ROJS, O., I. ZDOVC, A. DOVČ, J. ŽGAJNAR, B. SLAVEC, U. KRAPEŽ, J. A. AMBROŽIČ (2019): Presence and distribution of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* on poultry farms in Slovenia. *Appl. Poult. Res.* 28, 200-209.

## **9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA**

Lana Hadžić rođena je 28. veljače 1981. godine u Bihaću. Nakon završene III. gimnazije u Zagrebu, 1999. godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2007. godine i stekla titulu doktora veterinarske medicine.

Nakon završetka studija vježbenički staž odradila je u Veterinarskoj ambulanti „Šapa“ u Zagrebu i položila je stručni ispit. Od 2010. godine nakon odrađivanja vježbeničkog staža u J.U. „Veterinarski Zavod“ Bihać, zaposlena je na radnom mjestu stručnog suradnika u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane, vode i hrane za životinje. Od 2015. godine voditelj je spomenutog laboratorija. Kao voditelj laboratorija i član tima kvalitete ustanove u kojoj je zaposlena, prošla je brojne edukacije vezane uz sustav upravljanja kvalitetom i akreditacije laboratorija. Aktivno sudjeluje u pripremi i izvođenju velikog broja akreditiranih metoda te uvođenju novih, kao i u pripremi cjelokupne dokumentacije potrebne za održavanje akreditacije.

Od akademske god. 2011./2012. pohađa Doktorski studij iz veterinarskih znanosti. Tijekom dokorskog studija kao koautorica je sudjelovala na tri međunarodna znanstvena kongresa. Kao autorica i koautorica objavila je dva pregledna znanstvena rada.

## POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

PINTARIĆ, S., Z. ŠTRITOF, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2022): Resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. Proceedings of the conference Antimicrobial resistance in veterinary medicine: current state and perspectives, 21-23 June, Novi Sad, Serbia, pp. 128-140.

HADŽIĆ, L., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2021): Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 29, 3; 28-36.

JUKIĆ, H., S. DEDIĆ, Z. JUSUFHODŽIĆ, M. RODIĆ, L. HADŽIĆ (2018): Identification of *Listeria* spp. in foodstuffs in the city of Bihać. Proceedings of the 10th International Scientific and Professional Conference With food to health, 12-13 October, 2017. Osijek, Croatia, pp. 137-145.

PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs. 7th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 5-7 October, Zagreb, Croatia, pp. 56-56.