Uropatogena Escherichia coli : povezanost otpornosti na kinolone s prisutnošću činitelja virulencije

Barišić, Zvonimir

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:643333

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zvonimir Barišić

Uropatogena *Escherichia coli:* Povezanost otpornosti na kinolone s prisutnošću činitelja virulencije

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Ovaj je rad izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije u Splitu, te u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: Prof.dr.sc Vanda Plečko

Zahvala

Mentorici prof. dr. sc. Vandi Plečko zahvaljujem na uloženom trudu, nesebičnoj pomoći, vrijednim savjetima i velikom strpljenju.

Na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada posebno zahvaljujem mr. sc. Stjepanu Katiću, dipl.ing., doc.dr. sc. Ani Budimir, dr. sc. Zrinki Bošnjak, dr.med., prof. dr. sc. Aniti Markotić, Margareti Đurđević, dr. med., dipl. ing. Ljiljani Rogulja, dipl. ing. Zlatku Rogulja, dipl. ing. Aniti Rakić, kao i svim djelatnicima Službe za mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, te djelatncima Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Također zahvaljujem svojoj obitelji, na podršci i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Kazalo

1. Uvod **1**
1.1. Infekcije mokraćnoga sustava 1
1.2. Uropatogena *Escherichia coli* 5
1.2.1. Adhezini *E. coli* 6
1.2.2. Siderofori i toksini *E. coli* 9
1.2.3. Otoci patogenosti 11
1.3. Liječenje infekcija mokraćnoga sustava 11
1.3.1. β-laktamski antibiotici 12
1.3.2. Nitrofurantoin 13
1.3.3. Sulfametoksazol / trimetoprim 14
1.4. Kinoloni – mehanizam djelovanja 15
1.5. Otpornost bakterija na kinolone 19
1.5.1. Epidemiološki podaci 19
1.5.2. Mehanizmi otpornosti na kinolone 22

2. Cilj istraživanja **28**

3. Ispitanici, uzorci i metode istraživanja **30**
3.1. Ispitanici i uzorci 30
3.2. Određivanje broja leukocita u sedimentu urina 30
3.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika 31
3.4. Određivanje proizvodnje β-laktamaza proširenog spektra 32
3.5. Analiza mutacija na genu *gyrA* 32
3.5.1. RFLP-PCR 33
3.5.2. Sekvencioniranje gena *gyrA* 34
3.6. Analiza prisutnosti plazmidnih gena *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* 36
3.7. Određivanje prisutnosti činitelja virulencije 37
3.8. Indukcija otpornosti na kinolone 40
3.9. Statistička analiza podataka 41

4. Rezultati istraživanja **42**
4.1. Usporedba nalaza kod skupine bolesnika s izoliranom *E. coli* otpornom na kinolone s onima kontrolne skupine 46
4.1.1. Dob i spol bolesnika 46
4.1.2. Nalaz leukocita u sedimentu urina 47
4.1.3. Osjetljivost na druge antibiotike 49
4.1.4. Činitelji virulencije 58
4.1.5. Prisutnost plazmidnih gena otpornosti na kinolone 62
4.2. Prisutnost mutacija na genu *gyrA* 62
4.3. Karakteristike sojeva *E. coli* s induciranom otpornosti na kinolone 64
4.3.1. Osjetljivost na druge antibiotike 64
4.3.2. Prisutnost činitelja virulencije 66
4.3.3. Promjene na genu *gyrA* 67

5. Rasprava **68**
5.1. Odnos otpornosti na kinolone te dobi i spola bolesnika 68
5.2. Odnos otpornosti na kinolone i nalazu leukocita u sed.urina 69
5.3. Odnos otpornosti na kinolone i otpornosti na druge antibiotike 70
5.4. Odnos otpornosti na kinolone i prisutnosti činitelja virulencije 71
5.5. Prisutnost plazmidnih gena otpornosti na kinolone 75
5.6. Prisustvo mutacija na genu *gyrA* 76
5.7. Karakteristike sojeva s induciranom otpornosti na kinolone 80

6. Zaključci **84**

7. Sažetak **86**

8. Summary **89**

9. Popis literature **92**

10. Životopis **123**

1. Uvod

1.1. Infekcije mokraćnoga sustava

Akutne nekomplicirane infekcije mokraćnoga sustava ubrajaju se među najčešće neepidemijske bakterijske infekcije kod ljudi, a bakterija *Escherichia coli* je njihov glavni uzročnik [1, 2, 3, 4]. Smatra se da se na svijetu godišnje pojavi oko 150 milijuna infekcija mokraćnoga sustava [5]. Uzrokovane su bakterijama prisutnima u crijevnoj flori ljudi. Kod žena najčešće nastaju uzlaznim putem kroz uretru, čemu prethodi dugotrajna periuretralna i vaginalna kolonizacija, a kao uzročnike neki autori navode i bakterije koje koloniziraju spolne partnere [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Urin predstavlja dobar medij za rast bakterija, poglavito za rast bakterije *E. coli* [4]. Uvriježeni laboratorijski kriterij koji govori u prilog infekcije mokraćnoga sustava je prisutnost 10^5 ili više bakterija u 1 mililitru mokraće. [12].

Novorođenčad, djevojčice predškolske dobi, spolno aktivne žene te stariji muškarci i žene predstavljaju skupine kod kojih se infekcije mokraćnoga sustava najčešće javljaju [13]. Infekcije mokraćnoga sustava se mogu kretati u rasponu od asimptomatske bakteriurije, koja je karakterizirana prisutnošću bakterija u mokraći uz izostanak simptoma, cistitisa kod kojega je infekcija ograničena na mokraćni mjehur, te pijelonefritisa kod kojega dolazi do zahvaćanja bubrega. Uobičajeno je da cistitis prolazi bez posljedica, dok pijelonefritis može ostaviti trajne posljedice, pa čak dovesti i do smrtnog ishoda [14]. Klinički se infekcije gornjeg mokraćnog sustava mogu prepoznati po povišenoj tjelesnoj temperaturi i povišenom broju leukocita u krvi bolesnika [12]. Visoki rizik za nastanak infekcija mokraćnoga sustava imaju bolesnici s

anatomskim promjenama i opstrukcijama mokraćnog sustava, kao i oni s kompromitiranim imunološkim sustavom, te bolesnici s urinarnim kateterima [15, 16]. Kod ovakvih se bolesnika infekcije nazivaju kompliciranima [14]. Kod kompliciranih infekcija također su znatno češći uzročnici koji imaju fimbrijalne adhezine na svojoj površini [17]. Kompliciranе infekcije mokraćnoga sustava zahtijevaju drugačiji pristup i trajanje antimikrobnoga liječenja, kao i kasniju dodatnu dijagnostičku obradu mokraćnoga sustava [8]. Kod muškaraca se, općenito, sve infekcije smatraju kompliciranima. [8]

Asimptomatska bakteriurija se smatra infekcijom bakterijama niske virulencije, koje ne dovode do aktiviranja domaćinove obrane, te ne dolazi do pojave simptoma [18].

U dobi od 20 do 40 godina je 25 do 30% žena bilo liječeno od infekcije mokraćnoga sustava. Prevalencija asimptomatske bakteriurije je oko 3,5% u općoj populaciji i povećava se sa životnom dobi bolesnika, tako da oko 10% žena nakon 70 godina ima bakteriuriju [19]. Godišnje 40 do 50% žena doživi barem jednu infekciju mokraćnoga sustava [20].

Asimptomatska bakteriurija i leukociturija su prisutne u trećine bolesnika kod kojih se provodi hemodijaliza. Asimptomatsku bakteriuriju nije potrebno liječiti osim tijekom trudnoće, jer tada dilatacija mokraćnog sustava pogoduje širenju bakterija prema bubrezima. Polimikrobne infekcije su izuzetno rijetke, osim kod bolesnika s neurogenim mjehurom, litijazom, kroničnim bubrežnim apscesom, te kod dugotrajno kateteriziranih bolesnika. [12].

U literaturi su opisane i dvije izvanbolničke epidemije infekcija mokraćnoga sustava, koje su prepoznate metodama molekularne epidemiologije zbog jedinstvenog fenotipa i genotipa uzročnika [11].

Patogenetski, infekcije mokraćnoga sustava predstavljaju interakciju između patogena i domaćina [19].

Mokraćni sustav čovjeka je u normalnim uvjetima sterilan, zaštićen od štetnih mikroorganizama stalnim protokom mokraće, izlučenim protubakterijskim čimbenicima, kao i baktericidnom aktivnošću efektorskih imunih stanica [21].

Nespecifični mehanizmi obrane domaćina uključuju stalni protok mokraće, ljuštenje epitelnih stanica, prisutnost sekretornih IgA protutijela, izlučivanje Tamm-Horsfalove bjelančevine i kemokina.

Dok se na crijevnom i dišnom epitelu nalazi sluz koja prekriva epitel i sprječava adheziju patogena na glikoproteine i glikolipide koji se nalaze na epitelu, u mokraćnom sustavu ne postoji takva sluz, već zaštitu predstavlja topivi glikoprotein, po autorima nazvan Tamm–Horsfall-ov protein. Ova bjelančevina sadrži glikane s visokim udjelom manoze, tako da na sebe vezuje bakteriju *E. coli* koja ima fimbrije tipa 1, te tako sprječava njihovo vezivanje za epitelne stanice mokraćnoga sustava [2]. Ovaj se protein naziva još i uromodulin zbog jake imunosupresivne aktivnosti što se očituje kao inhibicija proliferacije T limfocita inducirane antigenom i inhibicija citotoksičnosti monocita *in vitro* [22, 23]. Tamm–Horsfall-ov protein, kada je prisutan u visokim koncentracijama, smanjuje bakterijsku fagocitozu od strane mišjih peritonealnih makrofaga u pokusu *in vitro* [24].

Kemokini, kakav je primjerice interleukin-8 dovodi do nakupljanja neutrofila u apikalni dio sluznice, dok se kod žena s bakteriurijom u urinu može otkriti povišena razina interleukina-6 [12, 25]. Ove interleukine izlučuju leukociti i stanice uroepitela [12].

Kod nekompliciranih infekcija mokraćnoga sustava, zahvaljujući navedenim mehanizmima obrane, infekcija obično prolazi kroz nekoliko dana [25].

Činitelji domaćina, u koje se ubrajaju navike i ponašanje pojedinca, mogu imati utjecaja na pojavu infekcija mokraćnoga sustava. Tako je opaženo da spolna aktivnost povećava učestalost infekcija kod žena, dok uporaba spermicidnih krema dovodi do poremećaja ekosustava rodnice što olakšava umnožavanje bakterije *E. coli* i povećava rizik nastanka infekcije [8]. Prethodno liječenje antibioticima koji uništavaju vaginalnu anaerobnu floru, kakav je npr. β – laktamski antibiotik amoksicilin, također povećava rizik od infekcije [8]. Povećani rizik nastanka infekcija mokraćnoga sustava usljed nedostatka estrogena, koji se javlja u menopauzi, može se smanjiti lokalnom primjenom estrogena koji normalizira vaginalnu floru [8]. Nasljedni činitelji također imaju ulogu u nastanku infekcija mokraćnog sustava, jer je obiteljska anamneza (majka s čestim infekcijama), također povezana s većom učestalošću nastanka infekcija [8, 26]. Dob manja od 15 godina kod prve infekcije mokraćnog sustava predstavlja povećani rizik za nastanak rekurentnih infekcija mokraćnog sustava [26]. Učestalost mokrenja i načini održavanje osobne higijene nisu pokazali značajnu razliku kao činitelji rizika u nastanku uroinfekcija [19, 27]. Anatomski odnosi, odnosno mala udaljenost od anusa do uretre kod žena, također predstavlja činitelj rizika jer bliski kontakt crijevnog sadržaja i uretre može pogodovati nastanku infekcije mokraćnog sustava [19].

Sok brusnice (lat. *Vaccinium macrocarpon*) sadrži tvar koja sprječava vezivanje sojeva *E. coli* s P–fimbrijama za eukariotske stanice, dok fruktoza iz soka ima djelovanje na sojeve *E. coli* s fimbrijama tipa 1 [28]. Aktivne tvar iz soka brusnice su proantocijanidini, tanini, stabilni spojevi fenola, te fruktoza i

hipurična kiselina [19, 29, 30]. Laboratorijski je pokazano da sojevi *E. coli* koji se uzgajaju u prisutnosti 10% soka brusnice pokazuju smanjenu ekspresiju P-fimbrija na svojoj površini [31]. Sok brusnice smanjuje pH urina te također značajno smanjuje stvaranje biofilma [32]. Sok brusnice predstavlja dobar izbor kao pomoćno sredstvo u prevenciji uroinfekcija jer je jeftin i na njega bakterije ne stvaraju otpornost [29].

1.2. Uropatogena *Escherichia coli*

Dosadašnje spoznaje izdvajaju kao uzročnike infekcija mokraćnoga sustava sojeve *E. coli* s posebnim, „uropatogenim“ svojstvima, što uključuje sposobnost adherencije, otpornost na litičko djelovanje komplementa odnosno otpornost na baktericidno djelovanje seruma, prisustvo siderofora (aerobaktin i enterobaktin) te prisutnost citotoksina kakav je npr. hemolizin [6, 19, 27, 33, 34, 35].

E. coli izolirana kod bolesnika s akutnim pijelonefritisom često ima prisutnu kombinaciju svih činitelja virulencije, što nije slučaj kod izolata iz stolice odnosno kod izolata tijekom cistitisa [36, 37, 38]. Do sličnog su zaključka došli i autori koji su proučavali sojeve *E. coli* kod pasa, kod kojih sojevi uzročnici uroinfekcija imaju činitelje virulencije, za razliku od rektalnih sojeva kojma činitelji virulencije nedostaju [39]. Činitelji bakterijske virulencije su ključni za savladavanje normalne obrane domaćina, što je bitno kod nastanka nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava, dok su za nastanak kompliciranih infekcija mokraćnoga sustava bitniji činitelji domaćina, odnosno izostanak nekih mehanizama obrane [19, 27].

1.2.1. Adhezini E. coli

Prvi i najbitniji korak u nastanku infekcije mokraćnoga sustava je adherencija uropatogene *E. coli* na stanice epitela mokraćnog sustava. To je nadzirano s tri elementa: adhezinima *E. coli*, receptorima na stanicama domaćina te mehanizmima obrane domaćina [2].

Adhezini uropatogene *E. coli* mogu postojati kao nitaste organele – fimbije ili pili, te kao nefilamentozne bjelančevine vanjske membrane. Adhezini povezani s fimbrijama su po kemijskom sastavu lecitini [18].

Početak infekcije mokraćnoga sustava predstavlja povezivanje bakterijskih fimbrija sa ugljikohidratnim sekvencama koje nose glikoproteini i glikolipidi na površini stanica epitela mokraćnoga sustava. Fimbrije se svrstavaju po svojoj specifičnosti za pojedine šećere. Tako fimbrije tipa 1 imaju afinitet za glikane s visokim udjelom manoze, sekretorni IgA i fibronektin, P fimbrije za Galα1,4Galβ disahardni završetak glikolipida, a S fimbrije NeuAcα2,3Gal sekvencu koja pokriva sijalinske glikane [18, 40, 41]. Uočeno je da postojanje kapsule „zaklanja“ i smanjuje funkciju ovih bakterijskih adhezina [42].

Najčešći adhezini su fimbrije tip 1. Smatra se da ih posjeduje 70-80% od svih izolata *E. coli* [43, 44]. Bakterija može imati 200 do 500 peritrihijalno poredanih fimbrija tipa 1 na svojoj površini [45]. Ove fimbrije aglutiniraju eritirocite zamorčića, a aglutinacija se može spriječiti s D-manozom, pa se zbog toga ove fimbrije nazivaju još i „manoza-osjetljive fimbrije“ [18]. Fimbrije tipa 1 su široke 7 nm i duge približno 1 do 3 μm i imaju oblik štapa [45, 46]. Veći dio fimbrije predstavlja polimer proteinske komponente FimA, na vrhu se nalaze podjedinice FimH koje imaju ulogu receptora, dok su komponente FimF i FimG

one koje povezuju podjedinice FimH s ostatkom fimbrije [45]. Fimbrije tipa 1 imaju značajnu ulogu u ranoj fazi infekcije, tijekom kolonizacije mokraćnog mjehura, a imaju ulogu i kod invazije u epitelne stanice [25, 36]. Njihova ekspresija je prisutna u početnim fazama infekcije, dok je u kasnijim fazama zamijenjena ekspresijom P fimbrija, koje su bitnije u kasnijim fazama bolesti [47]. Važne su i zbog vezanja na epitel probavnog sustava, što s povezuje s prijenosom s čovjeka na čovjeka [48]. Fimbrije tipa 1 imaju ulogu u invaziji bakterije *E. coli* u epitelne stanice mokraćnog mjehura, što je dokazano pokusima *in vitro*, dok takvu ulogu nemaju npr. P fimbrije [46]. Na mišjem modelu je pokazano da cjepljenje s FimH kao i izlaganje sluznice polipeptidu FimH sprječava urogenitalne infekcije s bakterijom *E. coli* [49]. Sojevi koji imaju fimbrije tipa 1 dovode do većeg izlučivanja interleukina (IL-6 i IL-8) od sojeva koji nemaju takve fimbrije [18, 50]. U novije vrijeme je otkrivena i njihova uloga u stvaranju biofilma na medicinskim implantatima i kateterima [25, 36]. Potvrđeno je da se fimbrije tip 1, odnosno njihov adhezin FimH specifično vezuje za CD48 receptore mastocita, stanica koje se nalaze u sluznici mokraćnog mjehura. To dovodi do oslobađanja medijatora upale, kao što su čimbenik nekroze tumora - α (engl. Tumor necrosos factor - α, TNF - α), leukotrien B_4 te histamin. Smatra se da su ovi medijatori upale odgovorni za simtome cistitisa, učestalo mokrenje, noćno mokrenje te bol na kraju mokrenja [51].

P fimbrije dovode do vezivanja *E. coli* s antigenima krvne grupe P koji se nalaze na uroepitelnim stanicama. Uz pospješivanje kolonizacije mokraćnog mjehura P fimbrije također povećavaju imuni odgovor na bakterije [14]. P fimbrije imaju ulogu kao okidači za upalu sluznice i češće se nalaze u sojeva *E. coli* koje uzrokuju infekcije gornjeg dijela mokraćnog sustava kao što je to pijelonefritis

[12, 18, 25, 52, 53]. Prisutne su na izolatima *E. coli* kod 80 % bolesnika s pijelonefritisom, kod 40-50% bolesnika s cistitisom te kod 20% bolesnika s asimptomatskom bakteriurijom odnosno u fekalnoj flori zdravih nositelja [18]. Gotovo svi sojevi *E. coli* uzročnici urosepse imaju P fimbrije [18]. Regulatorna bjelančevina PapB vezana za ekspresiju P fimbrija može inhibirati ekspresiju *fim* gena, odnosno isključiti prisustvo fimbrija tipa 1 u istoj stanici [54]. To se tumači čuvanjem energije i ekspresijom samo jedne vrste fimbrija koja je u tom trenutku potrebna za interakciju sa stanicama domaćina [54].

Dr fimbrije imaju ulogu u invaziji na epitelne stanice, a receptor im je GalNAc*β*(1-4)Gal*β* nastavak gangliotriaozilceramida (GgO_3Cer), što u stvari predstavlja antigen krvne grupe Dr, koji je široko rasprostranjen po cijelom mokraćnom sustavu [14, 25]. Receptori za Dr fimbrije nalaze se na bazalnim membranama tubula i Bowmanove kapsule, te zbog toga Dr fimbrije imaju značajnu ulogu u intersticijskom tropizmu *E. coli* i bitne su za nastanak kroničnog pijelonefritisa i glomeruloskleroze [55, 56]. Eksperimentalno je utvrđeno da cijepljenje miševa s fimbrijalnim Dr antigenom bakterije *E. coli* smanjuje mortalitet kod eksperimentalne infekcije s bakterijama koje nose taj antigen [57].

S fimbrije se vezuju za sijalil-galaktozide [14]. One se rijetko javljaju kod uropatogenih sojeva, a receptori za ovaj tip fimbrija se, slično kao kod P fimbrija, nalaze na epitelu mokraćnog mjehura, ureterima, te distalnim i proksimalnim tubulima bubrega [41, 53]

Rjeđe prisutni adhezini koje imaju uropatogene *E. coli* uključuju fimbrije tipa F1C, nefimbrijski adhezin 075X kao i bjelančevinu AufA [41, 58]. Fimbrije tipa F1C ne dovode do hemaglutinacije, za razliku od P i S fimbrija te fimbrija tipa 1

[59]. One se specifično vezuju za distalni bubrežni epitel i dovode se u vezu sa *E. coli* koja uzrokuje pijelonefritis [41,53]. Ovo vezivanje dovodi do izlučivanja interleukina-8 [47]. Adhezin 075X omogućava vezanje za bazalnu membranu i epitel, no ne dovodi se u vezu s većom učestalošću pojave infekcije mokraćnoga sustava. Receptori za ovaj adhezin nisu jasno određeni. [41, 53]

1.2.2. Siderofori i toksini E. coli

Rast u uvjetima snižene razine željeza dovodi do natjecanja bakterija s domaćinom za ione željeza. Bakterije izlučuju siderofore, bjelančevine male molekulske mase, kakve su npr. aerobaktin, enterobaktin i jersiniabaktin. Siderofori se vežu za ione željeza, a tako vezane siderofore s željezom prihvaća bakterija na receptore na svojoj vanjskoj membrani [60].

Uz adhezine i siderofore, sojevi uropatogene *E. coli* proizvode i toksine. Citotoksični nekrotizirajući čimbenik tipa 1 (engl. CNF 1) je citotoksin sastavljen od 1014 aminokiselina, izlučuje ga trećina uropatogenih sojeva *E. coli* i prisutan je kod 70% hemolitičnih sojeva *E. coli*, dok se rijetko javlja kod nehemolitičnih sojeva [21, 61, 62, 63]. Gen koji kodira ovaj toksin (*cnf1)* nalazi se na kromosomskom otoku patogenosti zajedno s genima koji kodiraju α-hemolizin (*hly*) i P fimbrije (*pap*) [64]. *In vitro* pokusom pokazano je da je oporavak eksperimentalne rane usporen ukoliko je izložena citotoksičnom nekrotizirajućem čimbeniku tipa 1 [62]. Uloga citotoksičnog nekrotizirajućeg čimbenika tipa 1 u nastanku infekcije mokraćnoga sustava je dvojbena, te se pretpostavlja da ima ulogu u dugoročnom uništavanju stanica mokraćnog mjehura, za razliku od hemolizina, koji ima trenutačno djelovanje [61].

E. coli proizvodi nekoliko vrsta hemolizina: α hemolizin je bjelančevina koju bakterija izlučuje u okolinu, pri čemu značajnu ulogu ima bjelančevina TolC, koja ga prenosi kroz vanjsku membranu stanične stijenke *E. coli*, β hemolizin koji je vezan za bakterijsku stanicu i γ hemolizin kojega izlučuju mutante otporne na nalidiksičnu kiselinu [65]. Hemolizini se međusobno razlikuju po tome što γ hemolizin ne može hemolizirati ljudske i kuničje eritrocite, za razliku od α i β hemolizina koji to mogu [60, 66]. Približno polovina sojeva *E. coli* izoliranih kod bolesnika s cistitisom i pijelonefritisom izlučuje hemolizin [61]. Zanimljivo je da je ta činjenica prvi put uočena i objavljena još daleke 1920. godine, a također u istoj studiji postoji podatak da sposobnost hemolize pokazuje samo 13% sojeva *E.coli* izoliranih iz stolice [67]. Hemolizini su citotoksični za različite vrste stanica, eritrocite, fibroblaste, granulocite i ostale vrste ljudskih leukocita, te također za stanice proksimalnih tubula ljudskog bubrega, što ima ulogu u patogenezi pijelonefritisa [68]. O djelotvornosti ovoga toksina *E. coli* govori činjenica da je za hemolizu jednog eritrocita na temperaturi 37°C dovoljno samo stotinjak molekula hemolizina [69].

U novije vrijeme je identificiran još jedan čimbenik virulencije: sekretorni autotransportni toksin – serin acetiltransferaza (SAT), heksamerna molekula koja se povratno inaktivira na temperaturi od 0ºC i koja pokazuje serinsku proteolitičku aktivnost, kao i citopatski učinak na VERO bubrežne stanice, te na stanice mokraćnoga mjehura [25, 60, 70, 71, 72, 73, 74]. Istom razredu serinskih proteolitičkih autotransportera kod *E. coli* (engl. SPATE) pripadaju i bjelančevine Pic i Tsh koji se češće javljaju kod uropatogenih sojeva *E. coli* nego kod crijevnih izolata iste bakterije. Točna uloga ovih bjelančevina u virulenciji uropatogene *E. coli* nije do kraja razjašnjena [73,75].

1.2.3. Otoci patogenosti

Uropatogena *E. coli* se razlikuje od ostalih sojeva prisutnošću gena virulencije. Geni koji su povezani s činiteljima virulencije: aerobaktin (*aer* i *iucC*), receptor za sidrofore (*iroN*), kapsula grupe II (*kpsMT*), kapsula grupe III (*capIII*), citotoksični nekrotizirajući čimbenik (*cnf1*), Dr-grupa adhezina (*drb*), hemolizin (*hly*), jersinijabaktin (*fyu*), povezanost s otpornošću na serum (*traT*), T bjelančevina vanjske membrane (*ompT*), obitelj P-fimbrija (*pap*), fimbrijski adhezin S i F1C (*sfa/foc*), sekretorni autotransportni toksin (*sat*), marker otoka patogenosti (*malX*) i fimbrije tipa 1 (*fim*) [9, 76, 77, 78].

Mnogi geni virulencije se mogu širiti horizontalno, jer su smješteni na mobilnim genskim elementima, otocima patogenosti (engl. pathogenicity islands – PAI) [25, 79, 80, 81, 82]. Neki geni su karakteristični za pojedine otoke patogenosti i mogu se koristi kao njihovi genetski biljezi. Tako su geni *hly* i *cnf1* karakteristični za PAI-I, *hly* i *pap* za PAI-II, *sfa* za PAI-III i *fyu* za PAI-IV [83, 84]

1.3. Liječenje infekcija mokraćnoga sustava

Antimikrobni lijekovi se koriste za liječenje infekcija mokraćnoga sustava još od otkrića sulfonamida 1932. godine [85, 86].

Čimbenici koji se moraju uzeti u obzir kod izbora antibiotika za liječenje infekcije mokraćnoga sustava su njegov spektar aktivnosti, vrsta bakterije uzročnika, prevalencija otpornosti u zajednici, trajanje liječenja, moguće nuspojave lijeka, farmakokinetika, kao i ekološke i ekonomske posljedice liječenja. Idealni antimikrobni lijek morao bi imati primarni put izlučivanja preko mokraćnog sustava kako bi postigao visoku koncentraciju u mokraći. Antibiotici koji postižu

visoku koncentraciju u vaginalnom sekretu, poput trimetoprima ili fluorokinolona, mogu biti efikasniji u djevanju na *E. coli* od lijekova kao što su nitrofurantoin i β-laktami, koji ne eradiciraju uropatogene bakterije iz rodnice [1, 85, 87, 88, 89]. Zbog stalne evolucije otpornosti bakterija na antibiotike, neophodno je trajno praćenje otpornosti da bi se poboljšale smjernice za iskustveno antibiotsko liječenje [88].

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća izbor antimikrobnih lijekova za liječenje infekcija mokraćnoga sustava uključivao je nitrofurantoin, nalidiksičnu kiselinu, cefaleksin, kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima, te amoksicilin.

U najnovije vrijeme u liječenje infekcija mokraćnoga sustava uključeni su fosfomicin, fluorokinoloni, kao i peroralni cefalosporini cefuroksim aksetil i cefiksim. Dugi niz godina se kao lijek „prve linije“ koristila kombinacija sulfametoksazola i trimetoprima [85].

1.3.1. β-laktamski antibiotici

Amoksicilin i ostali β-laktamski antibiotici indicirani su za upotrebu tijekom trudnoće ukoliko su infekcije mokraćnog sustava uzrokovane osjetljivim bakterijama, kao i za liječenje infekcija uzrokovanih gram pozitivnim bakterijama, npr. streptokokima grupe B. Kako je stopa otpornosti bakterije *E. coli* na amoksicilin u Splitsko-dalmatinskoj županiji 41,40%, to ograničava njegovu upotrebu kod iskustvenog liječenja infekcija mokraćnoga sustava [85, 90]. Mecilinam, β-laktamski antibiotik koji je u kliničku upotrebu u SAD i Kanadi uveden 1985. godine, pokazuje značajnu aktivnost prema gram-negativnim uzročnicima infekcija mokraćnoga sustava. Primjenjuje se u liječenju u obliku predlijeka pivmecilinama i efikasan je antibiotik za liječenje nekompliciranih

infekcija u izvanbolničkoj populaciji [91]. Kombinacije aminopenicilina s inhibitorima β – laktamaza često može dovesti do selekcije bakterija roda *Klebsiella* [28].

Peroralni cefalosporini, kao što su cefaleksin, cefuroksim aksetil, cefiksim i ceftibuten, moraju se primjenjivati u liječenju infekcija mokraćnoga sustava u trajanju od najmanje 7 dana [92]. Moguće ih je primjenjivati i tijekom trudnoće. Široki spektar njihovog djelovanja može dovesti do povećane učestalosti vulvovaginalne kandidijaze [85]. Liječenje cefalosporinima se dovodi u vezu s pojavom infekcija uzrokovanih enterokokima koji su otporni na glikopeptide, vjerojatno zbog selekcije, jer su enterokoki prirodno otporni na cefalosporine [93, 94]. Cefalosporini treće generacije su učinkoviti protiv enterobakterija, no njihova učinkovitost je nedovoljna kod stafilokoka [28]. Njihova uporaba može dovesti do kolonizacije odnosno infekcije uzrokovane bakterijama koje proizvode betalaktamaze proširenog spektra djelovanja (engl. ESBL) [94]. Niti jedan predstavnik cefalosporina se ne smatra antibiotikom izbora za liječenje infekcija mokraćnog sustava [85].

1.3.2. Nitrofurantoin

Nitrofurantoin se koristi u liječenju infekcija mokraćnoga sustava preko 50 godina [5]. Njegova upotreba se smanjila uvođenjem novijih lijekova kao što su sulfonamidi i kinoloni, no prisutno je postepeno ponovno vraćanje u uporabu zbog trajno niskih stopa otpornosti kod uobičajenih uropatogena. Može ga se koristiti u trudnoći, kod djece, te u dugotrajnoj primjeni za sprječavanje rekurentnih infekcija mokraćnoga sustava. Kako ne postiže visoke koncentracije u serumu, ne preporučuje se za liječenje akutnog pijelonefritisa, a

kontraindiciran je i kod bolesnika s zatajenjem bubrega [85]. U nekim državama (npr. Nizozemska) nitrofurantoin je preporučen kao prvi lijek izbora za empirijsko liječenje infekcija mokraćnoga sustava [95]

1.3.3. Sulfametoksazol / trimetoprim

Trimetoprim je prvi put upotrebljen za liječenje infekcija kod ljudi 1962. godine, dok se u kombinaciji sa sulfametoksazolom se koristi od 1968. godine [86]. Trimetoprim, sam ili u kombinaciji s sulfametoksazolom, predstavljao je glavni lijek za liječenje infekcija mokraćnoga sustava u posljednjih 20 godina. Samostalna primjena trimetoprima je indicirana kod bolesnika s alergijom na sulfonamide i takvo se liječenje pokazalo jednako efikasno s manje nuspojava od liječenja kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima. Provedene studije pokazuju bolju učinkovitost kombinacije sulfametoksazola i trimetoprima od ampicilina, jer bolje uklanja fekalnu, vaginalnu i periuretralnu kolonizaciju [28]. U posljednje vrijeme je zabilježen značajan porast stope otpornosti na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima kod cistitisa uzrokovanog bakterijom *E coli* [85, 90, 96]. Ukoliko lokalne stope otpornosti na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima porastu preko 10-20%, da se taj lijek više ne može koristiti u iskustvenom liječenju infekcija mokraćnoga sustava, već se u liječenju koriste fluorokinoloni [97, 98]. Iskustveno liječenje kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima je jeftinije od trodnevnog liječenja kinolonima kod nekompliciranih infekcija mokraćnoga sustava, osim ako stopa otpornosti za kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima u zajednici ne prelazi 22% [99].

1.4. Kinoloni – mehanizam djelovanja

Fluorokinoloni se zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava i zbog spektra djelovanja smatraju jednom od najdjelotvornijih skupina antimikrobnih lijekova korištenih u kliničkoj i veterinarskoj medicini u današnje vrijeme [100]. Kinoloni, lijekovi koji pripadaju nafthidrinskoj skupini, dostupni su od šezdesetih godina prošlog stoljeća, a otkriveni su u procesu sinteze i purifikacije klorokina [101]. Nalidiksična kiselina je prvi predstavnik kinolona, u kliničkoj je uporabi od 1962. godine i korištena je isključivo za liječenje infekcija mokraćnoga sustava [102]. Osamdesetih godina su uvedeni noviji, snažniji fluorirani kinoloni sa širim spektrom djelovanja, koji se mogu primijeniti kod infekcija kosti, zglobova, za liječenje sustavnih infekcija, te za liječenje infekcija spolnog, probavnog i dišnog sustava. Tu se ubrajaju norfloksacin, koji je uveden 1986. godine, te ciprofloksacin, koji se koristi od 1987. godine [103, 104].

Kinoloni su prikladni za liječenje infekcija mokraćnoga sustava jer postižu visoku koncentraciju u mokraći i imaju široki spektar djelovanja [105].

Po svom antimikrobnom djelovanju kinoloni se mogu svrstati u četiri generacije. Kinoloni prve generacije (nalidiksična kiselina, pipemidinska kiselina i cinoksacin), koji se u današnje vrijeme rijetko koriste, imaju umjereno djelovanje na gram negativne bakterije i minimalnu sistemsku distribuciju. Kinoloni druge generacije (norfloksacin, ofloksacin i ciprofloksacin) imaju prošireno djelovanje na gram negativne bakterije i djeluju na unutarstanične, „atipične“ patogene, uz ograničeno djelovanje na gram pozitivne bakterije. Najsnažnije im je djelovanje na aerobne gram negativne bakterije. Ciprofloksacin je i dalje najaktivniji kinolonski antibiotik za bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*. Kinoloni treće generacije (levofloksacin, sparfloksacin, gatifloksacin) zadržavaju prošireno

djelovanje na gram negativne i „atipične“ unutarstanične patogene, uz poboljšano djelovanje na gram pozitivne bakterije. Konačno, kinoloni četvrte generacije (trovafloksacin, moksifloksacin) djeluju na anaerobe, bolje pokrivaju gram pozitivne bakterije, uz zadržavanje djelovanja na gram negativne bakterije [102, 106].

Fluorokinoloni imaju malo utjecaja na anaerobne bakterije crijevne flore, dok značajno utječu na gram negativne bakterije (prolazno eliminiraju bakterije roda *Enterobacteriaceae*). Čak i nakon parentralnog davanja ciprofloksacina zapaženo je značajno smanjenje broja bakterija roda *Enterobacteriaceae* u crijevnoj flori dobrovoljaca, dok broj ostalih bakterijskih vrsta nije bio promijenjen [107, 108].

Fluorokinoloni djeluju tako da inhibiraju bakterijske enzime topoizomeraze [101, 109]. Topoizomeraze su enzimi koji održavaju DNK u replikacijskim i nereplikacijskim područjima bakterijskog kromosoma. Postoje četiri topoizomeraze: topoizomeraza I, topoizomeraza II (poznata i kao DNK giraza), topoizomeraza III i topoizomeraza IV.

Kinoloni djeluju inhibicijski na topoizomerazu II (DNK girazu) i topoizomerazu IV, dok ne djeluju na topoizomerazu I i III. [110, 111]

DNK giraza je tetramer sastavljen od dvije GyrA i dvije GyrB podjedinice i kodirana je genima *gyrA* and *gyrB*. Topoizomeraza IV ima sličnu strukturu i sastavljena je od dvije ParC i dvije ParE podjedinice, a kodirana je genima *parC* i *parE*. Podjedinica ParC je homologna s podjedinicom GyrA, dok je podjedinica ParE homologna s podjedinicom GyrB. [101, 109, 110]. Djelovanje kinolona na pojedine vrste topoizomeraza se vezuje s vrstom bakterija. Tako je kod gram pozitivnih bakterija više zahvaćena topoizomeraza IV, dok je kod gram-

negativnih više zahvaćena DNK giraza [102, 110, 112, 113, 114, 115]. Kod *E. coli* primarno ciljno mjesto za kinolone je DNK giraza, i to njezina podjedinica GyrA [116]. Mutacije gena *gyrB* također dovode do otpornosti na kinolone, no učestalost ovih mutacija je znatno rjeđa od mutacija na genu *gyrA* [117].

Topoizomeraza II, poznatija kao DNK giraza, je enzim koji uvija prstenastu bakterijsku DNK na tisuću puta manju duljinu da bi se mogla smjestiti u bakteriju. Superuzvojnica DNK se pomoću DNK giraze također prevodi u relaksirani oblik, odnosno provodi se negativno superuvijanje odnosno rasplitanje dvostruke uzvojnice DNK pred replikacijskim rašljama, što je važno u početnoj fazi umnožavanja DNK. Bez djelovanja ovog enzima se jako uvijena bakterijska DNK ne bi mogla umnožavati. [100, 109, 110, 114, 118]. Ovaj proces uključuje prekidanje dvolančane DNK, dovođenje segmenta DNK koji se razmata preko mjesta prekida, te reakcija završava ponovnim povezivanjem prekinutih lanaca [89, 115, 116]. Fluorokinoloni djeluju tako da stabiliziraju kompleks između DNK giraze i DNK, odnosno stvaraju nepovratno povezane spojeve što dovodi do prekida umnožavanja DNK [102, 110, 112, 113, 114, 115, 119, 120]. Trenutni prekid umnožavanja DNK zbog djelovanja kinolona može se potumačiti stvaranjem kovalentnih spojeva pred replikacijskim rašljama [114]. Srazom ovog kompleksa s replikacijskim rašljama započinje niz događaja, koji uključuju aktivaciju SOS sustava, koji u konačnici dovode do smrti stanice [101, 121].

Iako se DNK giraza smatra dominantnim ciljem kinolonskih antibiotika, topoizomeraza IV predstavlja također značajno mjesto njihovog djelovanja [112]. Nakon završenog umnožavanja DNK topoizomeraza IV odjeljuje DNK lance koji nastaju tijekom umnožavanja, što olakšava njihovu podjelu u stanice

nakon diobe [102, 109, 110, 112, 113, 114, 115]. Fluorokinoloni djeluju na topoizomerazu IV i blokiraju razdvajanje novonastalih lanaca DNK, te tako inhibiraju umnožavanje DNK. [102, 112, 114, 115, 119]. Taj je proces spor jer topiozomeraza IV ima primarnu ulogu iza replikacijskih rašlji, pa tako staničnim mehanizmima preostaje više vremena za popravak lezije DNK [114]. Eksperimentalno je dokazano da je potrebna od 3 do 30 puta veća koncentracija konolona za inhibiciju topiozomeraze IV nego za inhibiciju DNK giraze kod *E. coli*, odnosno da topoizomeraza IV predstavlja sekundarni cilj za konolone [117].

Fluorokinoloni inhibiraju enzime stabilizirajući kompleks DNK – DNK giraza, odnosno kompleks DNK – topoizomeraza IV. Stabilizirani kompleks DNK – DNK giraza stvara fizičku prepreku pomicanju replikacijskih rašlji, te tako sprječava umnožavanje DNK [109, 115].

Sisavci posjeduju enzim koji djeluje na DNK slično kao DNK giraza [100]. Eukariotska topoizomeraza II ima djelomičnu homologiju u slijedu aminokiselina s bakterijskom DNK girazom, pa stoga ljudski enzim može biti potencijalni cilj za štetno djelovanje kinolona kod ljudi. Koncentracija kinolona koja je potrebna da inhibira timusnu topoizomerazu II je preko 100 puta veća od one koja je potrebna da inhibira bakterijsku DNK girazu, odnosno od 50 do 100 puta je veća od koncentracije kinolona koja se postiže u ljudskim tekućinama i tkivima (s izuzetkom mokraće i stolice). Stoga je djelovanje kinolona na ljudsku topoizomerazu II vrlo rijetka pojava [89]. Eukariotska topoizomeraza II se također može blokirati tvarima kao što je etopozid, no takve tvari ne mogu biti korištene kao antibiotici jer ne mogu dospjeti u bakterijsku stanicu zbog efikasne bakterijske efluksne pumpe [122]. Postojanje tvari koje blokiraju

eukariotsku topoizomerazu II značajno je zbog istraživanja novih lijekova koji bi mogli biti djelotvorni kod bakterija otpornih na kinolone [122].

1.5. Otpornost bakterija na kinolone

1.5.1. Epidemiološki podaci

Prije 1990. godine se otpornost *E. coli* na kinolone rijetko zapažala [123]. U godinama kada su kinoloni bili uvođeni na tržište smatralo se da će otpornost na njih biti rijetka zato što oni spadaju u ksenobiotike, odnosno, ne nalaze se prirodno u tijelu čovjeka [104]. Pretjerana i nekontrolirana uporaba kinolona u kliničkoj i veterinarskoj medicini dovodi do sve veće otpornosti bakterija te smanjuje učinkovitost kinolona za buduću primjenu [124]. Taj dugotrajni selektivni antimikrobni pritisak povezuje se s otpornošću bakterija na antibiotike [98, 125, 126].

Pretjerana uporaba jednog predstavnika kinolona dovodi do razvoja otpornosti na cijelu kinolonsku skupinu antibiotika [89, 102]. Tako, primjerice, kinoloni koji se dodaju u životinjsku hranu selektiraju sojeve *E. coli* koji su otporni na kinolone korištene za liječenje ljudi [116, 119]. U veterinarskoj medicini u primjeni je veliki broj kinolonskih antibiotika: danofloksacin, difloksacin, enrofloksacin, ibafloksacin, marbofloksacin, orbifloksacin te sarafloksacin [127]. U literaturi je objavljen podatak da se u državama Europske unije u veterinarske svrhe potroši 3494 tone antimikrobnih tvari godišnje, od čega je 43 tone fluorokinolona [128]. U Čileu se zbog primjene u akvakulturi godišnje troši preko 100 tona kinolonskog antibiotika flumekina, dok je godišnja potrošnja kinolona u humanoj medicini 10 do 12 tona [129]. Veliki broj uzoraka pilećeg mesa sa

tržnica na Tajvanu je kontaminiran *E. coli* smanjene osjetljivosti na kinolone [130, 131]. Španjolska i Portugal spadaju među države s najvećom potrošnjom antibiotika, te također među države s najvišim stopama otpornosti na kinolone [132, 133]. Tako jedna španjolska studija pokazuje da su 45% svinja i 90% pilića bili nosioci sojeva *E. coli* otpornih na kinolone, što predstavlja najveću do sada opisanu prevalenciju takve otpornosti u svijetu [134].

U Pekingu je koncem prošlog stoljeća 50% izvanboničkih sojeva *E. coli* bilo otporno na ciprofloksacin, a od tog broja je 80% sojeva imalo MIK za ciprofloksacin veći ili jednak 32 µg/ml [135]. Studija iz Nizozemske potvrđuje da povećano propisivanje fluorokinolona dovodi do povećanja otpornosti na fluorokinolone kod *E. coli* u izvanbolničkih bolesnika [136], a tu činjenicu potvrđuju i studije provedene u Sloveniji, SAD-u, kao i multicentrična studija provedena u 14 europskih država [137, 138, 139].

Istraživanje provedeno u jednom staračkom domu pokazalo je da prethodna uporaba fluorokinolona predstavlja jedini neovisni činitelj rizika za crijevno nosilaštvo sojeva *E. coli* otpornih na fluorokinolone [140], a taj činitelj rizika potvrđuju i druge, na sličan način provedene, studije [141, 142, 143].

Studija provedena u Njemačkoj pokazuje da je otpornost *E. coli* na fluorokinolone češća u bolnici u kojoj je veća potrošnja, a slična korelacija ne postoji između potrošnje kinolona i stopa otpornosti za stafilokoke i *Pseudomonas aeruginosa* [144]. Indonezijska studija pokazuje da je stopa otpornosti na florokinolone u fekalnoj flori kod bolesnika na prijemu u bolnicu bila 6%, dok je stopa otpornosti na istu skupinu antibiotika prilikom otpusta iz bolnice bila čak 23% [145]

Stopa otpornosti na fluorokinolone može i opadati, ovisno o smanjenju potrošnje u populaciji, što je uočeno u Sloveniji i Slovačkoj [146]

Liječnici obiteljske medicine često doživljavaju otpornost na antibiotike kao problem na nacionalnoj razini, na kojeg nema utjecaja njihovo propisivanje antibiotika [147].

Otpornost izolata *E. coli* na fluorokinolone je česta u Europi, posebno kod bolesnika s infekcijom mokraćnoga sustava i kod bolesnika od karcinoma koji zbog neutropenije profilaktički primaju fluorokinolone [148, 149]. Često su za ove bolesnike izvor bakterijemije kronične uroinfekcije, povezane s kateterizacijom i liječenje fluorokinolonima [123]. Niske doze kinolona pogoduju selekcioniranju otpornih sojeva, što nije zapaženo kod davanja kinolona u terapijskim dozama [115, 150, 151]. Tako je čak uočeno da izlučivanje kinolona znojem dovodi do selekcije stafilokoka otpornih na kinolone u flori kože [152]. Zbog zapažanja da niske doze kinolona pogoduju nastanku mutacija, uveo se pojam „koncentracije koja sprječava mutacije“ (engl. mutation preventing concentracion – MPC), kao koncentracije lijeka u serumu koja se mora postići da se ne bi potaknule mutacije i nastanak otpornih sojeva [104]. Čak i kod kratkotrajnog trodnevnog liječenja infekcije mokraćnog sustava ciprofloksacinom dolazi do selekcije i pojave sojeva *E. coli* otpornih ciprofloksacin u crijevima [153].

Nosilaštvo otpornih sojeva kod djece, kod kojih se fluorokinoloni vrlo rijetko primjenjuju, kao i kod odraslih koji nisu prethodno liječeni kinolonima, sugerira neke druge načine izlaganja kinolonima u populaciji [115]. Utvrđeno je da se u različitim onkološkim centrima javljaju međusobno različiti sojevi *E. coli* otporni na fluorokinolone, dok se unutar jednog onkološkog centra najčešće javljaju isti

otporni sojevi *E. coli*, što govori za horizontalni prijenos otpornih sojeva među bolesnicima [154].

Učestalost mutanti *E. coli* nakon izlaganja rastućim koncentracijama ciprofloksacina u laboratorijskim uvjetima bila je od 10^{-8} do 10^{-9}. Niska učestalost mutacija objašnjava zbog čega je za razvoj kliničkih izolata *E. coli* otpornih na kinolone trebalo proteći nekoliko godina njihove kliničke primjene [123].

1.5.2. Mehanizmi otpornosti na kinolone

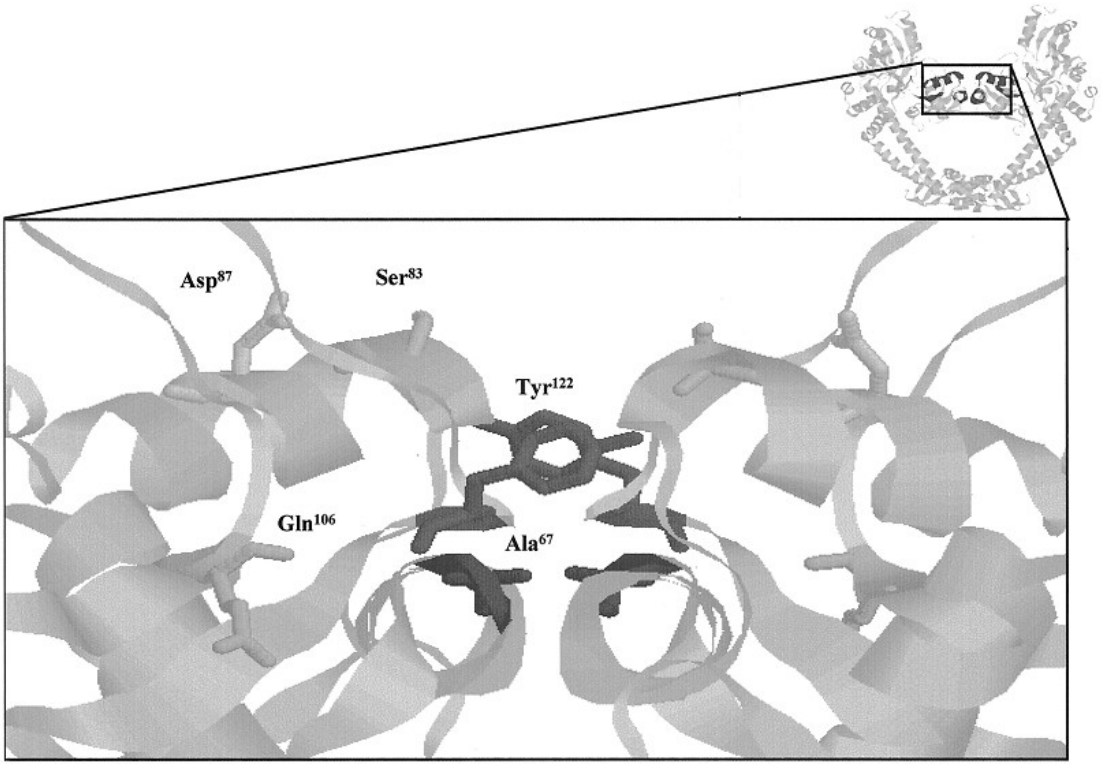
Otpornost bakterija na kinolone nastaje raznolikim mehanizmima i ima značajan klinički utjecaj. Mehanizmi otpornosti uključuju promjenu ciljne molekule za lijek, pojačanu aktivnost efluksne pumpe i promjenu propusnosti stanične membrane zbog smanjene aktivnosti porina. Nisu opisani bakterijski enzimi koji mijenjaju ili razgrađuju kinolone, oni su prisutni jedino kod nekih vrsta gljiva [101, 115, 119].

Mnogi su autori uočili da prisustvo kinolona djeluje na smanjenje adhezije *E. coli* na uroepitelne stanice. To se događa zbog inhibicije sinteze ili ekspresije adhezina, te zbog smanjene proizvodnje fimbrija (što se posebno odnosi na P fimbrije) [105]. Objavljeno je kliničko opažanje da se kao uzročnici invazivnih infekcija mokraćnoga sustava (prostatitis i pijelonefritis) češće javljaju sojevi *E. coli* osjetljivi na kinolone, za razliku od sojeva otpornih na kinolone koji su češći uzročnici cistitisa i asimptomatske bakteriurije [155]. Također je uočeno da subinhibitorne koncentracije norfloksacina koje profilaktički primaju bolesnici od ciroze umanjuju bakterijsku adherenciju sojeva *E. coli* na epitelne stanice [156].

1.5.2.1. Kromosomske mutacije

Najviše su proučavane promjene u ciljnoj molekuli, enzimu topoizomerazi. Ove promjene mogu nastati zbog spontanih mutacija gena koji kodiraju enzimske podjedinice i takve mutacije nastaju rijetko, kod jedne od 10^6-10^9 stanica u bakterijskoj populaciji. Kod GyrA i ParC podjedinica otpornih bakterija, promjene aminokiselina se nalaze na N-završetku koji sadrži tirozin, koji se kovalentno vezuje za prekinute lance DNK tijekom djelovanja enzima.

U dijelovima GyrA i ParC postoje regije koje su povezane s otpornošću na kinolone (*eng*. quinolone resistance determining regions - QRDR). Zamjene aminokiselina u ovom području dovode do porasta otpornosti na kinolone jer mutacije mijenjaju ciljna mjesta na koja se kinoloni vezuju i smanjuju afinitet kinolona na enzim (slika 1) [116, 119, 157].



Slika 1. Regija povezana s otpornošću na kinolone (QRDR) bjelančevine GyrA. Preuzeto iz Barnard i Maxwell [157]

Četiri najčešće točkaste mutacije koje dovode do otpornosti na fluorokinolone su mutacija na genu *gyrA* na poziciji 248 koja dovodi do zamjene serina (83), dok ona na poziciji 249/250 dovodi do zamjene asparaginske kiseline (87), te mutacije na genu *parC* na poziciji 238/239 koja dovodi do zamjene serina (80) i na poziciji 250/251 koja dovodi do zamjene glu (84) [158, 159]. U novije vrijeme su zapažene i neke rjeđe mutacije na genu *gyrA* koje također dovode do povećanja otpornosti na kinolone. Takva je mutacija koja dovodi do zamjene aminokiseline alanina na poziciji 51 s valinom [160]. Mutacija koja dovodi do zamjene serina na poziciji 83 s leucinom ili triptofanom manifestira se kao visoki stupanj otpornosti na kinolone, dok zamjena s alaninom dovodi do niskog stupnja otpornosti na kinolone [122]. Kod bakterije *E. coli* mutacije nastupaju u više faza, pri čemu je uobičajeno da mutacija gena *gyrA* nastupa kao prvi korak, nakon čega slijedi mutacija na genu *parC* [119, 161].

Kod GyrB i ParE podjedinica otpornih bakterija promjene aminokiselina su smještene u središnjem dijelu, na domeni uključenoj u međudjelovanje s komplementarnom podjedinicom (GyrA i ParC) [115]. Kod *gyrB* mutacije najčešće nastaju na pozicijama 426 (zamjena asparaginske kiseline s asparaginom) i 447 (zamjena lizina s glutaminskom kiselinom) [162].

O broju točkastih mutacija na genima *gyrA* i *parC* ovisi da li će otpornost na konolone biti vrlo niska - MIK od 0,125 do 0,5mg/L (jedna mutacija), umjerena – MIK 1 - 4 mg/L (dvije mutacije), visokog stupnja – MIK 8 - 64 mg/L (tri točkaste mutacije), odnosno najvišeg stupnja – MIK ≥ 128 mg/L (četiri točkaste mutacije) [117, 158, 163, 135, 131, 164]. Minimalna inhibitorna koncentracija od 8 do 64 mg/L sugerira da se radi o najmanje dvije zamijenjene aminokiseline na bjelančevini GyrA [123].

Mutacije se mogu javiti brzo tijekom liječenja kinolonima i mogu biti značajan čimbenik koji ograničava uporabu ovih antibiotika [102].

1.5.2.2. Smanjena aktivnost porina

Da bi dosegli svoje ciljno mjesto u bakterijskoj citoplazmi, enzim DNK girazu, fluorokinoloni moraju proći kroz citoplazmatsku membranu, a kod gram negativnih bakterija još i kroz vanjsku membranu stanične stijenke .

Ulaz u stanicu se odvija kroz porine [100, 115]. Porini su kanali kroz koje molekule prolaze kroz staničnu membranu. Smanjena aktivnost porina bitan je mehanizam otpornosti antibiotika kod gram negativnih bakterija. Kod *E. coli* smanjena ekspresija bjelančevina vanjske membrane OmpF i OmpC djeluje na ulaz fluorokinolona u bakterijsku stanicu [119].

1.5.2.3. Ekspresija efluksne pumpe

Važan prirodni mehanizam otpornosti bakterija na fluorokinolone je ekspresija efluksne pumpe, koja je ovisna o energiji i koja može aktivno ukloniti kinolone iz stanice [104, 109]. Sve je veći broj izvještaja koji pokazuju da je efluks glavni mehanizam u otpornosti na antibiotike [165]. Kod gram-negativnih bakterija, ovakav sustav ima tri komponente: efluksnu pumpu smještenu u citoplazmatskoj membrani, bjelančevinu vanjske membrane, te membransku fuzijsku bjelančevinu koja povezuje dvije navedene komponente. Za proces izbacivanja lijeka iz citoplazme potrebna je energija. Pumpe ovakvog tipa također postoje i kod gram pozitivnih bakterija. Povećana količina ovakvih pumpi je povezana s niskom razinom otpornosti na fluorokinolone. Ovakvi efluksni sustavi omogućavaju otpornost bakterija na različite tvari koje imaju

različite strukture (*eng*. multidrug resistance pump), te tako nastaje otpornost na više vrsta antibiotika kao i tolerancija na različite kemijske tvari kao što je heksan [166, 167, 168]. Komponente takve pumpe kod *E. coli* su efluksna pumpa AcrB, membranska fuzijska bjelančevina AcrA i bjelančevina vanjske memmbrane TolC, dok su regulacijski geni za tu efluksnu pumpu *acrR*, *marA*, *robA* i *soxS* [115]. AcrAB je član RND (*eng*. resistance nodulation division) obitelji pumpi. AcrAB/TolC efluksni sustav ima široki spektar supstrata što uključuje kinolone, tetracikline, kloramfenikol, ampicilin, rifampicin, puromicin, organska otapala, eterična ulja, boje, dezinfekcijska sredstva i deterdžente. Bjelančevina AcrAB se uobičajeno proizvodi u malim količinama, no proizvodnja može biti de-reprimirana brojnim regulacijskim sustavima (*marA*, *marR*, *soxS*, *rob*) kao i mutacijama represora *acrAB* i *acrR* [169]. De-represija *acrAB* ne dovodi do otpornosti visokog stupnja na kinolone, nego češće do otpornosti niskog stupnja na više različitih antibiotika [116], odnosno može povećati otpornost na kinolone za četiri do šest puta [135, 170]

Otpornost visokog stupnja na kinolone opisana je kao posljedica kombinacije kromosomske mutacije na *gyrA* i *parC* genima s mutacijama na genima povezanima s efluksnom pumpom i propusnošću vanjske membrane [116, 135, 171].

1.5.2.4. Plazmidska otpornost na kinolone

Kod bakterije *Klebsiella pneumoniae* je 1998. godine otkriven plazmid pMG252 koji nosi gen otpornost na kinolone *qnr* (po novoj nomenklaturi *qnrA*). Bjelančevina Qnr (sada QnrA), pentapeptid koji je kodiran genom *qnr*, vezuje se za DNK girazu (također i topoizomerazu IV), te sprječava vezanje kinolona

[101, 172, 173, 174]. Ovaj je pentapeptid srodan kromosomski kodiranom pentapeptidu MfpA kod bakterije *Mycobacterium smegmatis*, a koji je također odgovoran za otpornost na kinolone [104]. Plazmid pMG252 se konjugacijom može prenijeti u čitav niz bakterijskih vrsta kao što su *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* Typhimurium i *Pseudomonas aeruginosa*. Zanimljiva je činjenica da plazmid pMG252 uz gen *qnr* nosi još čitav niz gena vezanih za otpornost bakterija, kakvi su npr. geni *ampR*, *ampC* i *sul1*, a kao posljedica toga je potvrđena je povezanost otpornosti na kinolone i β-laktamske antibiotike [5, 101, 175, 176]. Američka studija provedena u periodu od 1999 do 2004 pokazala je da među sojevima *E. coli* otpornim na ceftazidim njih 4% posjeduje gen *qnr* [177]. Studije pokazuju da je među izolatima *E. coli* otpornim na ciprofloksacin prisustvo gena *qnrA* rijetko, ispod 2%, s izuzetkom studije u Šangaju, gdje je 7,7% sojeva *E. coli* otpornih na ciprofloksacin imalo taj gen [173, 178]. U novije doba su otkriveni novi plazmidni geni odgovorni za otpornost na kinolone, *qnrB* otkriven u SAD-u i Indiji 2004. godine, te q*nrS*, otkriven u Japanu 2005 godine [179]. Ovi novootkriveni geni također kodiraju pentapeptide i sličnost u slijedu aminokiselina s bjelančevinom QnrA iznosi 40% [180]. Plazmidi, odnosno geni porodice *qnr* odgovorni su za kinolonsku otpornost niskog stupnja, no klinički su značajni jer mogu pojačati ostale oblike otpornosti, nastale zbog kromosomskih mutacija, pojačane aktivnosti efluksne pumpe, te zbog smanjene aktivnosti porina [175]. Istraživanja pokazuju da se mogući prirodni rezervoar gena *qnr* nalazi u bakteriji *Shewanella algae*, koja se nalazi u morskoj i slatkoj vodi, što povezuje uporabu kinolona u akvakulturi sa selekcijom otpornih sojeva ove bakterija te prijenosom gena na ostale bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* [129, 181].

2. Cilj istraživanja

Otpornost na kinolone nastaje ili zbog kromosomske mutacije na genima koji kodiraju enzim topoizomerazu ili zbog mutacija na genima povezanima s efluksnom pumpom i propusnošću vanjske membrane. Otpornost na kinolone takodjer može nastati i zbog prisutnosti plazmida koji nosi gen otpornosti *qnr*.

Pretpostavka je da će sojevi *E. coli* koji su otporni na kinolone zbog prisutnih mutacija na genima imati također i veću učestalost mutacija gena koji su povezani s činiteljima virulencije (hemolizin, P fimbrije, fimbrije tipa 1, citotoksični nekrotizirajući čimbenik 1), te će zbog toga takvi otporni sojevi imati i promijenjenu ekspresiju navedenih činitelja virulencije.

Također je pretpostavka da će sojevi *E. coli* koji su otpornost na kinolone stekli genetskim mutacijama imati i češće mutacije na genima odgovornim za otpornost na ostale antibiotike koji se najčešće koriste za liječenje infekcija mokraćnoga sustava (ampicilin, cefalosporini prve, druge i treće generacije), te će zbog toga imati i povećanu otpornost na takve antibiotike.

Pretpostavka je da će kod sojeva *E. coli* osjetljivih na kinolone, kod kojih se u laboratorijskim uvjetima inducira otpornost na tu skupinu antibiotika, ujedno doći i do promjena činitelja virulencije, odnosno da će oni postati slični sojevima *E. coli* otpornima na kinolone koji su uzrokovali infekcije mokraćnog sustava, a kod kojih su manje izraženi činitelji virulencije.

Opći cilj ovog istraživanja je steći uvid u karakteristike sojeva uropatogene *E. coli* otporne na kinolone s obzirom na molekularne mehanizme otpornosti, prisutnost činitelja virulencije i otpornost na ostale antibiotike koji se koriste za liječenje infekcija mokraćnoga sustava te utvrditi razliku u odnosu na karakteristike sojeva koji su osjetljivi na kinolone.

Specifični cilj istraživanja je utvrditi koliko laboratorijski inducirana otpornost na kinolone kod prethodno osjetljivih sojeva mijenja ostale karakteristike sojeva (prisutnost činitelja virulencije te otpornost na ostale antibiotike koji se najčešće koriste za liječenje infekcija mokraćnoga sustava).

3. Ispitanici, uzorci i metode istraživanja

3.1. Ispitanici i uzorci

Tijekom jednogodišnjeg razdoblja su se iz uzoraka urina, dobivenih od izvanbolničkih bolesnika sa simptomima infekcije mokraćnog sustava sa područja Splitsko-dalmatinske županije izolirali svi sojevi *E. coli* otporni na kinolone, koji su bili uzročnici infekcije.

Identifikacija sojeva do razine vrste obavljena je standardnim postupkom (kratki biokemijski niz), dok je probir sojeva otpornih na kinolone (ciprofloksacin) napravljen disk-difuzijskom metodom po važećim standardima američkoga Instituta za klinički i laboratorijski standard (Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI) [182, 183, 184].

Kontrolna skupina se formirala tako da se za svaki soj otporan na kinolone uzeo slijedeći izolirani bolesnički soj *E. coli* koji nije bio otporan na kinolone.

U radu nisu bili testirani niti prikazani sojevi kopije.

Demografski pokazatelji, kao što su dob i spol bolesnika, prikupljeni su uz svaki bakterijski soj uključen u istraživanje.

3.2. Određivanje broja leukocita u sedimentu urina

U sedimenta urina iz kojeg je izolirana *E. coli* određen je broj leukocita mikroskopskim promatranjem sedimenta urina na vidnom polju velikog povećanja (400x).

3.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Za sojeve *E. coli* otporne na kinolone, kao i za sojeve kontrolne skupine, određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za ciprofloksacin To je najmanja koncentracija ciprofloksacina koja inhibira vidljivi rast bakterija *in vitro*. Minimalna inhibitorna koncentracija je određena mikrodilucijskom metodom po standardu CLSI-a na Müller-Hinton-ovom bujonu [183, 185]. Istom metodom su određene i minimalne inhibitorne koncentracije za ampicilin kao i za cefalosporine prve, druge i treće generacije, kako bi se mogla uočiti povezanost otpornosti na te antibiotike s otpornošću na kinolone. Raspon koncentracija antibiotika iznosio je od 0,06 do 128 mg/L. Antibiotik je razrjeđivan dvostruko serijski u nizu epruveta i tako razrjeđena otopina je u količini od 100 µL ukapana u jažice na mikrotitarskoj pločici. Kultura testiranog soja razrjeđivana je tako da se dobila koncentracija inokuluma od $5x10^5$ CFU/mL, nakon čega je u količini od 100 µL ukapana u jažice na mikrotitarskoj pločici i pomiješana s otopinom antibiotika. Pločice su inkubirane preko noći na 37ºC i slijedeći dan su očitane minimalne inhibitorne koncentracije.

Izračunat je MIK_{50}, kao koncentracija antibiotika potrebna da inhibira 50% testiranih sojeva i MIK_{90}, kao koncentracija antibiotika potrebna da inhibira 90% testiranih sojeva.

Kao kontrola korišten je soj *E. coli* ATCC 25922.

3.4. Određivanje proizvodnje β-laktamaza proširenog spektra

Metodom dvostrukog diska je ispitano da li ispitivani sojevi *E. coli* proizvode β-laktamaze proširenog spektra djelovanja (engl. extended spectrum betalactamases - ESBL) [183]. Bakterijska suspenzija gustoće 0,5 McFarland-a je nanesena na površinu Müller-Hinton-ovog agara, nakon čega je u sredinu postavljen disk koji sadrži 20 μg amoksicilina i 10 μg klavulanske kiseline. Oko njega su postavljeni diskovi koji su sadržavali ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson i aztreonam, na udaljenosti 30 mm od središnjeg diska. Test se smatrao pozitivnim ukoliko je došlo do povećanja zone inhibicije u blizini središnjeg diska.

3.5. Analiza mutacija na genu *gyrA* kod sojeva *E.coli* otpornih na kinolone

Genski pokazatelji otpornosti na kinolone, mutacije na genu *gyrA,* odredila se metodom praćenja polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimerazom za sve sojeve koji su bili otporni na kinolone (engl. restriction fragment lenght polymorphism polymerase chain reaction - RFLP-PCR). U tom postupku se najprije umnožila DNK gena *gyrA*, nakon čega se dobivena DNK cijepala restrikcijskim enzimom *Hinf* I. Dobiveni fragmenti su se razdvojili elektroforezom u agaroznom gelu. Kako ta metoda daje rezultate za ograničeni broj genskih lokusa, dodatno se za reprezentativni broj izolata

napravilo i sekvencioniranje gena da bi se odredili položaj točkastih mutacija unutar gena *gyrA* odnosno njegove regije QRDR [163, 186, 187, 188, 189]
Kao kontrola korišten je soj *E. coli* ATCC 25922.

3.5.1. RFLP-PCR

Izolacija DNA izvedena je kuhanjem suspenzije testiranih sojeva 10 minuta na 95ºC.
Začetnici za lančanu reakciju polimeraze isporučeni su liofilizirani (Sigma). U sterilnom kabinetu se otopila količina liofiliziranog začetnika u 1 mL vode, te su se napravila razrjeđenja do željene koncentracije začetnika od 50 pmol/L.
U istraživanju su korišteni slijedeći začetnici [188, 190]:
EC-GYRA-A
(5-CGCGTACTTTACGCCATGAACGTA-3)
EC-GYRA-HinfI
(5-ATATAACGCAGCGAGAATGGCTGCGCCATGCGGACAATCGAG-3)
U sterilnu epruvetu je otpipetirano 25 µL PCR mješavine (PCR Master, Roche), 20 µL sterilne destilirane vode i 3 µL uzorka, te po 1 µL otopine svakog začetnika.
U uređaju Perkin-Elmer 9600 je obavljeno umnažanje (amplifikacija).
Termalni ciklusi za gen *gyrA* bili su:

inicijalna denaturacija 94°C 3 minute

nakon čega slijedi 40 ciklusa:

denaturacija 94°C 60 sekundi

sljepljivanje 53°C 50 sekundi

ekstenzija 72°C 50 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C.

Produkt PCR reakcije je nakon toga precipitiran u prisutnosti Na acetata i izopropilnog alkohola na -20ºC, te je nakon centrifugiranja resuspendiran u 70% etilnom alkoholu. Nakon centrifugiranja, odlijevanja alkohola i sušenja, produkt je resuspendiran u 10 µL sterilne destilirane vode.

Digestija s restrikcijskim enzimom *Hinf* I provedena je u otopini koja je sadržavala 8 µL produkta PCR reakcije, 1 µL *Hinf* I (Roche) i 1 µL 10x digestijskog pufera (Roche) na temperaturi od 37ºC u trajanju od jednog sata.

Produkti restrikcije su detektirani elektroforezom u gelu. Pripremljeni agarozni gel (2% agaroze u 1x TAE puferu) stavljen je u kadu za elektroforezu nakon čega je dodano toliko 1x TAE pufera da pokrije gornju površinu gela. U prvu jažicu gela je dodan molekularni marker (DirectLoad wide range DNA marker, Sigma), dok su u ostale jažice ukapani uzorci. Elektroforeza u gelu se odvijala na sobnoj temperaturi u trajanju od oko jednog sata pri naponu od 100 V. Nakon toga se gel obojao otopinom etidijeva bromida i osvjetlio na transluminatoru, te snimio kamerom. Interpretacija je napravljena po rasporedu i veličini dobivenih fragmenata [188].

3.5.2. Sekvencioniranje gena gyrA

Uzorak za sekvencioniranje je pripremljen lančanom reakcijom polimeraze koja je provedena u dvije faze (engl. nested PCR).

Za prvi korak su korišteni začetnici:

*gyrA*_QRDR_F: 5-TACACCGGTCAACATTGAGG

*gyrA*_QRDR_R: 5-TTAATGATTGCCGCCTCGG

Termalni ciklusi u prvom koraku su bili:

inicijalna denaturacija 94°C 5 minuta

nakon čega slijedi 35 ciklusa:

denaturacija 94°C 45 sekundi

sljepljivanje 65°C 45 sekundi

ekstenzija 72°C 40 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C, i hlađenje na 4°C.

Produkt približne veličine 650 bp bio je pročišćen u gelu (Qiagen Gel Extraction Kit) te korišten u drugom koraku lančane reakcije polimeraze.

U drugom koraku su korišteni ovi začetnici:

*gyrA*_QRDR2_F: 5-CCGTCCCGTACTTTACGC

*gyrA*_QRDR2_R: 5-CCGTATAACGCATTGCCGC

Termalni ciklusi u drugom koraku su bili:

inicijalna denaturacija 94°C 5 minuta

nakon čega slijedi 35 ciklusa:

denaturacija 94°C 45 sekundi

sljepljivanje 55°C 45 sekundi

ekstenzija 72°C 60 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C, i hlađenje na 4°C. Konačni produkt približne veličine 200 bp je sekvencioniran uz korištenje *gyrA*_QRDR2_F kao začetnika reakcije sekvencioniranja [191]. Sekvencioniranje je provedeno na uređaju ABI Prism 377 Genetic Analyser

(Applied Biosystems), a dobiveni podaci su analizirani kompjuterskim programom Bioedit [192]

3.6. Analiza prisutnosti plazmidnih gena *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*

Prisutnost plazmida koji nosi gene *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*, a koji su povezani s otpornošću na kinolone određivala se metodom lančane reakcije polimeraze za sve sojeve koji su bili otporni na kinolone [193, 194, 195].

Kao kontrola korišten je soj *E. coli* J53 Azir koji ima prisutan gen *qnr* [196].

Izolacija DNA izvedena je kuhanjem suspenzije testiranih sojeva 10 minuta na 95ºC.

Začetnici za lančanu reakciju polimeraze isporučeni su liofilizirani (Sigma). U sterilnom kabinetu se otopila količina liofiliziranog začetnika u 1 mL vode, te su se napravila razrjeđenja do željene koncentracije začetnika od 50 pmol/L.

U istraživanju su korišteni slijedeći začetnici [197]:

qnrA

5_-ATTTCTCACGCCAGGATTTG

5_-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA

qnrB

5_-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG

5_-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC

qnrS

5_-ACGACATTCGTCAACTGCAA

5_-TAAATTGGCACCCTGTAGGC

U sterilnu epruvetu je otpipetirano 25 µL PCR mješavine (PCR Master, Roche), 20 µL sterilne destilirane vode i 3 µL uzorka, te po 1 µL otopine svakog začetnika.

U uređaju Perkin-Elmer 9600 je obavljeno umnažanje (amplifikacija).

Termalni ciklusi za gene *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* bili su:

inicijalna denaturacija 94°C 3 minute

nakon čega je slijedilo 32 ciklusa:

denaturacija 94°C 45 sekundi

sljepljivanje 53°C 45 sekundi

ekstenzija 72°C 60 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedila je inkubacija od 10 minuta na 72°C.

Pripremljeni agarozni gel (2% agaroze u 1x TAE puferu) stavljen je u kadu za elektroforezu nakon čega je dodano toliko 1x TAE pufera da pokrije gornju površinu gela. U prvu jažicu gela je dodan molekularni marker (DirectLoad wide range DNA marker, Sigma), dok su u ostale jažice ukapani uzorci. Elektroforeza u gelu se odvijala na sobnoj temperaturi u trajanju od oko jednog sata pri naponu od 100 V. Nakon toga se gel obojao otopinom etidijeva bromida i osvjetlio na transluminatoru, te snimio kamerom. Interpretacija je napravljena po rasporedu i veličini dobivenih fragmenata [197].

3.7. Određivanje prisutnosti činitelja virulencije

Činitelji virulencije su za sojeve *E. coli* određeni fenotipskim postupcima ili postupcima molekularne mikrobiologije.

Kao kontrola korišten je soj *E. coli* ATCC 25922.

Proizvodnja hemolizina kod sojeva *E. coli* određena je fenotipskom metodom, promatranjem prisutnosti hemolize ovčjih eritrocita u blizini kolonija testiranog soja na krvnom agaru [66, 198]. Provedene studije su pokazale da fenotipska metoda daje jednake rezultate kao i određivanje prisutnosti gena odgovornog za hemolizu [17].

Prisutnost gena *pap, fim* i *cnf1* u ispitivanim sojevima određena je metodom lančane reakcije polimeraze i na taj način je dokazana prisutnost činitelja patogenosti P fimbrija, fimbrija tipa 1, kao i prisutnost citotoksičnog nekrotizirajućeg čimbenika 1 [198, 199, 200].

Izolacija DNA izvedena je kuhanjem suspenzije testiranih sojeva 10 minuta na 95ºC.

Začetnici za lančanu reakciju polimeraze isporučeni su liofilizirani (Sigma). U sterilnom kabinetu se otopila količina liofiliziranog začetnika u 1 mL vode, te su se napravila razrjeđenja do željene koncentracije začetnika od 50 pmol/L.

U istraživanju su korišteni slijedeći začetnici:

Za gen *papC*: [201, 202]

papC1 (5'-GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3')

papC2 (5'- ATATCCTTTCTGCAGGGAT GCAATA-3')

Za gen *fimH*: [202]

fimH1 (5'-TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3')

fimH2 (5'-GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA-3')

Za gen *cnf1*: [201]

CNF1-A (5'-GAACTTATTAAGGATAGT-3')

CNF1-B (5'-CATTATTTATAACGCTG-3')

U sterilnu epruvetu je otpipetirano 25 µL PCR mješavine (PCR Master, Roche), 20 µL sterilne destilirane vode i 3 µL uzorka, te po 1 µL otopine svakog začetnika.

U uređaju Perkin-Elmer 9600 je obavljeno umnažanje (amplifikacija).

Termalni ciklusi za gen *papC* bili su:

inicijalna denaturacija 94°C 3 minute

nakon čega slijedi 25 ciklusa:

denaturacija 94°C 60 sekundi

sljepljivanje 65°C 60 sekundi

ekstenzija 72°C 60 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C.

Termalni ciklusi za gen *fimH* bili su:

inicijalna denaturacija 94°C 3 minute

nakon čega slijedi 25 ciklusa:

denaturacija 94°C 60 sekundi

sljepljivanje 55°C 60 sekundi

ekstenzija 72°C 60 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C.

Termalni ciklusi za gen *cnf1* bili su:

inicijalna denaturacija 94°C 2 minute

nakon čega slijedi 33 ciklusa:

denaturacija 94°C 60 sekundi

sljepljivanje 55°C 60 sekundi

ekstenzija 72°C 60 sekundi

Nakon posljednjeg ciklusa slijedi inkubacija od 10 minuta na 72°C.

Pripremljeni agarozni gel (2% agaroze u 1x TAE puferu) stavljen je u kadu za elektroforezu nakon čega je dodano toliko 1x TAE pufera da pokrije gornju površinu gela. U prvu jažicu gela je dodan molekularni marker (DirectLoad wide range DNA marker, Sigma), dok su u ostale jažice ukapani uzorci. Elektroforeza u gelu se odvijala na sobnoj temperaturi u trajanju od oko jednog sata pri naponu od 100 V. Nakon toga se gel obojao otopinom etidijeva bromida i osvjetlio na transluminatoru, te snimio kamerom. Interpretacija je napravljena po rasporedu i veličini dobivenih fragmenata [201, 202].

3.8. Indukcija otpornosti na kinolone

U laboratorijskim uvjetima se za reprezentatvni broj sojeva *E. coli* iz kontrolne skupine, koji su osjetljivi na kinolone, izvela indukcija otpornosti na kinolone izlaganjem sojeva sve većim koncentracijama antibiotika ciprofloksacina. Početna koncentracija ciprofloksacina kojom su bakterije bile izložene bila je polovina minimalne inhibitorne koncentracije, nakon čega se koncentracija ciprofloksacina udvostručavala sve dok se nije uočio prestanak vidljivog rasta bakterija [83, 66, 121, 203, 204]. Kod sojeva kod kojih je na taj način inducirana otpornost na kinolone pratio se utjecaj novostvorene otpornosti na kinolone na promjene gena odgovornih za otpornost na kinolone (mutacije na genu *gyrA* i eventualno pojavljivanje plazmidnih gena *qnr*), te na promjene prisutnosti

činitelja virulencije (hemolizin, P fimbrije, fimbrije tipa 1, citotoksični nekrotizirajući čimbenik 1), prethodno opisanim metodama.

3.9. Statistička analiza podataka

Statistička analiza dobivenih podataka provedena je na računalu korištenjem programa PAST [205]. Provedena je deskriptivna analiza podataka, kod kontinuiranih varijabli prikazani su medijan i centili, dok su kategoričke varijable prikazane kao broj opažanja u tablicama frekvencija. Usporedba među promatranim skupinama s obzirom na dob i spol bolesnika, prisutnost leukocita u nalazu sedimenta urina, osjetljivost na druge antibiotike koji se koriste za liječenje infekcija mokraćnoga sustava, te prisustvo činitelja virulencije provedena je parametrijskim i neparametrijskim statističkim metodama. Neparametrijske statističke metode, kakav je Mann-Whitney-ev U test, korištene su za usporedbu između grupa prilikom analize kvantitativnih podataka, dok su za analizu kvalitativnih varijabli korišteni statistički postupci za analizu tablica kontigencije, kao što su χ^2 test, te Fischer-ov egzaktni test.

Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti $p < 0,05$.

4. Rezultati istraživanja

Zbirni prikaz rezultata ovog istraživanja po bakterijskim sojevima je prikazan u tablici 1, dok je detaljni prikaz rezultata naveden u slijedećim odlomcima.

BR	*DOB*	*SPOL*	*SED*	*AMX*	*CF*	*CXM*	*GM*	*CAZ*	*CTX*	*CRO*	*CIP*	*FEP*	*pap*	*Fim*	*cnf*	*HEM*
2	64	Ž	R	8	32	8	1	0,06	0,5	0,06	16	1	0	0	0	
3	52	Ž	D	128	16	8	1	0,25	0,5	0,008	4	0,25	0	0	0	
4	75	Ž	Mn	128	16	8	0,25	0,5	0,25	0,008	8	0,125	0	0	0	
10	67	Ž	N	128	16	8	128	0,25	1	0,008	32	0,125	0	0	0	
11	80	Ž	R	128	16	8	32	0,25	0,5	0,008	32	0,006	0	0	0	
15	76	Ž	N	128	8	8	64	0,12	0,125	0,03	16	0,06	0	0	0	
19	74	Ž	D	128	128	8	1	2	1	0,5	8	2	1	0	0	
21	61	Ž	N	128	32	8	0,25	16	1	0,25	32	0,5	0	0	0	
23	74	Ž	N	128	8	8	0,5	0,25	0,125	0,03	2	0,25	0	0	0	
25	83	Ž	N	128	32	8	0,5	4	0,25	0,25	32	1	0	1	0	
26	58	Ž	R	128	16	8	1	2	0,5	0,25	128	0,25	0	0	0	
27	82	M	N	128	8	8	0,5	0,5	0,125	0,008	4	0,125	0	0	0	
29	79	Ž	N	128	8	8	0,5	0,5	0,06	0,008	32	0,25	1	1	0	
31	74	Ž	R	128	16	16	0,5	2	0,25	0,25	32	0,25	0	0	0	
34	72	Ž	R	128	16	8	1	0,25	0,06	0,008	2	0,06	0	0	0	
35	76	Ž	N	128	32	16	128	1	0,125	0,12	32	0,125	0	0	0	H
36	79	Ž	N	128	16	8	64	0,008	0,5	0,25	32	1	0	0	0	
37	84	Ž	N	128	16	16	1	0,008	1	1	16	1	0	0	0	
38	79	Ž	D	128	128	128	1	4	8	16	64	128	1	0	0	
39	72	M	N	128	128	128	128	0,008	16	16	64	128	0	0	0	
40	52	Ž	N	128	64	128	64	0,008	16	16	32	2	0	0	1	
43	64	M	N	128	64	8	1	0,008	1	0,12	32	1	0	1	0	
47	81	Ž	D	128	128	32	0,5	0,12	16	8	8	128	1	0	0	
48	68	M	Mn	128	32	8	2	0,008	0,25	0,12	8	0,25	0	0	0	
51	67	Ž	D	128	16	16	128	1	0,5	0,5	64	0,25	0	0	0	
55	23	Ž	R	128	8	8	32	1	0,06	0,008	16	0,06	0	0	0	
58	81	Ž	N	128	8	8	0,25	0,5	0,12	0,06	16	0,06	0	0	0	
60	68	M	Mn	128	8	8	0,5	0,5	0,008	0,06	32	0,06	1	0	0	
64	72	Ž	N	128	8	8	0,25	0,5	0,03	0,06	4	0,125	0	1	0	
65	49	Ž	D	128	8	8	0,25	0,5	0,03	0,06	16	0,06	0	0	0	
67	76	M	N	128	16	8	1	0,25	0,03	0,12	64	0,125	0	0	0	
69	79	Ž	D	128	8	8	0,5	0,25	0,12	0,06	32	0,125	1	0	0	
74	59	Ž	N	128	8	8	0,25	0,25	0,25	0,06	4	0,125	0	0	0	
78	79	Ž	N	4	16	8	0,5	2	0,06	0,12	8	0,5	1	0	0	
79	66	M	N	128	8	8	0,5	0,25	0,12	0,06	8	0,06	0	1	0	
84	73	M	R	128	16	8	64	0,25	0,25	0,12	8	0,06	0	0	0	
86	78	M	R	128	8	8	0,5	4	0,12	0,12	4	0,125	0	0	0	
88	83	Ž	N	8	4	16	0,5	0,5	0,5	0,12	32	0,25	0	0	0	
95	36	M	M	128	16	8	16	0,5	0,12	0,06	32	2	0	0	0	
96	78	Ž	D	128	2	8	0,5	0,12	0,06	0,015	8	0,015	1	0	0	
97	76	Ž	D	128	16	8	0,5	16	8	0,5	8	4	1	0	0	
98	11	Ž	N	128	16	8	0,5	16	8	0,5	8	4	1	0	0	
100	82	Ž	Mn	128	16	8	1	0,5	0,5	0,06	128	0,12	0	0	0	
101	80	M	D	128	16	32	4	1	2	0,5	64	1	0	0	0	

BR	DOB	SPOL	SED	AMX	CF	CXM	GM	CAZ	CTX	CRO	CIP	FEP	pap	Fim	cnf	HEM
104	71	Ž	D	128	4	8	0,5	0,12	0,25	0,06	4	0,5	1	0	0	
110	85	Ž	N	128	8	8	0,25	0,06	0,06	0,06	8	0,06	0	1	0	
118	62	Ž	Mn	128	8	8	2	0,25	0,06	0,06	64	0,125	1	0	0	
119	73	Ž	R	128	16	16	0,5	0,5	0,06	0,06	16	0,125	1	0	0	H
124	35	Ž	N	128	4	0,25	4	0,06	0,06	0,06	16	0,06	0	1	0	
125	26	Ž	Mn	128	8	0,06	0,25	0,06	0,06	0,06	32	0,125	0	1	0	
130	79	Ž	R	128	8	8	16	0,06	0,06	0,06	64	0,5	0	1	0	
131	85	Ž	N	128	8	8	8	0,5	0,06	0,06	16	0,125	0	0	0	
134	28	Ž	R	128	8	4	1	0,06	0,06	0,06	64	0,125	0	1	0	
135	84	Ž	N	128	4	4	0,25	0,25	0,06	0,06	64	0,125	0	0	0	
137	75	M	D	128	32	32	0,5	0,5	0,25	0,125	4	1	1	1	0	
138	65	Ž	N	128	16	16	2	0,06	0,06	0,06	64	0,125	1	1	0	
140	66	Ž	D	128	4	2	0,25	0,25	0,06	0,06	4	0,06	0	0	0	
144	78	Ž	R	128	8	4	128	0,125	0,06	0,06	32	0,125	0	0	0	
149	59	Ž	R	128	32	16	1	0,5	0,06	0,06	32	0,25	0	0	0	
150	83	Ž	N	128	8	4	1	0,25	0,06	0,06	16	0,06	0	0	0	
155	26	Ž	N	128	16	8	2	0,25	0,06	0,06	16	0,125	0	0	0	
160	74	Ž	R	128	8	16	0,5	0,5	0,06	0,06	64	0,125	1	0	0	
162	30	Ž	R	128	8	16	1	0,5	0,06	0,06	128	0,25	1	1	0	
166	58	Ž	N	128	4	4	1	0,25	0,06	0,06	16	0,06	0	0	0	
167	82	M	D	128	16	32	1	0,5	0,125	0,125	128	0,25	0	0	0	
171	79	M	R	128	128	8	128	0,25	0,06	0,125	32	0,06	0	0	0	
178	71	M	Mn	128	16	16	0,25	0,25	0,125	0,125	32	1	0	0	0	
179	77	Ž	R	128	16	4	128	0,25	0,06	0,06	32	0,25	0	0	0	
185	75	Ž	N	128	64	64	0,5	2	0,06	0,06	128	0,25	0	0	0	
198	60	M	D	128	4	2	0,5	0,06	0,06	0,06	4	0,06	0	1	0	
203	81	Ž	N	128	8	8	0,25	0,5	0,06	0,06	8	0,25	0	0	0	
204	44	Ž	N	128	2	4	0,25	0,125	0,06	0,06	32	0,06	0	0	0	
209	79	Ž	R	128	8	8	128	0,25	0,06	0,06	8	0,06	0	0	0	
210	26	Ž	N	128	8	8	16	0,25	0,06	0,06	16	0,25	0	0	0	
211	48	Ž	R	128	8	8	1	0,125	0,06	0,06	16	0,06	1	0	0	
212	84	M	D	128	8	2	1	0,125	0,06	0,06	8	0,06	0	0	0	
213	30	Ž	N	128	0,06	4	0,06	0,06	0,06	0,06	8	0,06	0	0	0	
214	69	Ž	D	128	16	8	64	0,25	0,06	0,06	8	0,06	0	0	0	
216	62	Ž	R	128	128	4	64	8	0,06	0,25	32	0,125	0	0	0	
224	82	M	N	128	128	8	128	1	0,06	0,5	64	0,125	0	1	0	
225	56	Ž	N	128	16	16	128	4	4	0,5	64	0,5	0	0	0	
227	68	Ž	R	128	8	128	32	0,25	0,06	0,125	16	0,5	0	0	0	
233	71	M	N	128	128	32	0,5	8	0,5	0,5	32	0,25	0	1	0	
235	77	Ž	R	128	128	16	1	1	1	1	16	0,5	0	1	0	
236	80	Ž	N	128	32	16	64	4	2	0,25	64	0,06	0	1	0	
237	78	Ž	R	128	16	128	128	8	2	0,125	32	0,125	0	0	0	
239	81	Ž	Mn	128	128	128	128	16	128	128	16	0,125	0	1	0	
269	1	M	D	128	32	128	1	1	64	4	0,25	128	0	1	0	H
270	11	Ž	D	128	32	4	2	1	1	0,5	0,25	0,5	0	1	0	
271	9	Ž	N	16	16	2	2	1	1	0,25	0,06	0,25	0	1	0	H
272	78	Ž	R	8	32	2	2	2	2	1	0,06	8	0	1	0	H
274	69	Ž	R	8	8	2	2	1	0,125	0,5	0,25	0,25	0	0	0	H
276	74	Ž	N	128	32	2	2	1	0,125	2	0,5	8	0	1	1	
286	66	Ž	D	128	128	2	2	1	0,125	1	0,06	8	1	1	0	H
287	84	Ž	D	4	8	2	8	1	0,125	1	0,25	8	0	1	0	
288	51	Ž	N	4	8	2	1	0,5	0,06	0,06	0,06	0,06	1	1	0	H
292	1	M	N	128	32	128	8	8	16	8	0,06	128	1	1	0	
294	83	Ž	Mn	4	8	2	8	1	0,125	0,25	0,5	0,06	1	1	0	H
295	50	Ž	R	8	8	4	1	2	1	0,5	0,06	0,06	1	1	0	H

BR	DOB	SPOL	SED	AMX	CF	CXM	GM	CAZ	CTX	CRO	CIP	FEP	pap	Fim	cnf	HEM
298	5	Ž	R	128	4	4	1	1	0,06	0,25	0,06	0,06	1	1	1	
299	22	Ž	R	128	8	2	2	2	1	1	0,25	8	0	1	0	
300	57	Ž	D	4	16	2	2	4	1	1	0,25	8	1	1	1	H
304	61	Ž	D	128	16	2	2	4	1	1	0,06	8	0	1	0	
312	2	Ž	R	128	128	4	8	2	1	2	0,06	8	1	1	0	H
313	69	Ž	R	128	128	32	8	16	4	8	0,5	8	0	1	0	H
320	45	Ž	D	128	32	2	8	1	0,06	0,5	0,5	8	1	1	0	H
323	73	Ž	R	128	32	2	1	2	1	1	0,06	8	1	1	0	
329	82	Ž	Mn	128	32	2	2	8	2	1	0,06	8	0	1	0	
330	2	M	N	128	128	16	1	2	1	1	0,06	8	0	1	0	
331	30	Ž	N	128	128	16	2	2	1	1	0,5	8	0	0	0	
337	58	M	Mn	4	32	4	2	2	1	1	0,5	8	1	0	0	H
338	40	Ž	D	128	64	4	8	0,5	1	0,125	0,5	0,06	1	1	0	H
343	74	Ž	R	4	8	2	8	0,5	1	0,25	0,06	0,06	1	1	0	H
351	49	Ž	R	128	128	128	8	2	64	16	0,25	128	1	1	0	H
356	35	Ž	R	128	32	4	8	2	1	1	0,06	8	1	1	1	H
358	79	Ž	R	128	16	4	1	2	2	1	0,06	8	0	1	0	
359	9	Ž	R	8	32	4	8	8	4	2	0,06	8	0	1	0	H
360	80	Ž	N	8	8	8	8	1	0,06	0,125	0,06	0,06	1	1	0	
362	90	Ž	D	128	8	4	8	8	2	1	0,25	1	1	1	0	
369	64	M	N	128	32	2	1	1	1	1	0,5	0,06	1	1	0	H
381	23	Ž	D	128	32	2	1	2	1	2	0,25	2	1	1	1	H
383	38	Ž	N	8	8	4	1	1	0,06	0,125	0,06	0,06	1	1	0	H
386	3	Ž	R	4	8	4	1	2	0,125	0,25	0,5	0,06	0	1	0	
390	4	Ž	R	4	8	2	1	2	0,25	0,06	0,06	0,06	1	1	0	H
395	36	Ž	N	4	8	2	2	4	1	2	0,5	8	1	1	0	
396	46	Ž	N	128	64	8	2	0,5	0,06	0,125	0,06	1	0	1	0	H
398	15	Ž	N	8	8	4	2	0,5	0,125	0,06	0,25	0,06	0	1	0	
400	73	Ž	N	128	64	128	8	8	16	2	0,5	128	1	1	0	
402	49	Ž	D	128	64	4	1	2	1	0,06	0,06	0,5	1	1	0	
403	34	Ž	R	4	8	2	8	2	1	0,06	0,125	1	0	1	0	
410	86	Ž	Mn	128	32	8	0,06	1	0,06	0,06	0,06	0,06	1	1	0	
411	65	Ž	R	128	128	128	1	32	16	32	0,06	8	0	1	0	
413	53	Ž	R	128	64	8	8	2	1	1	0,06	2	0	1	0	
415	76	Ž	D	128	32	2	8	0,5	0,06	0,25	0,06	0,25	1	1	0	H
417	58	Ž	D	128	32	4	1	1	0,125	0,25	0,06	1	1	0	0	H
439	5	Ž	N	8	32	4	1	4	1	1	0,06	8	0	1	0	
448	32	Ž	R	2	4	2	1	8	1	1	0,06	8	0	1	0	
451	20	Ž	D	16	32	4	1	2	1	1	0,06	8	0	1	1	H
452	79	Ž	R	4	8	4	8	2	1	1	0,25	8	0	1	0	H
456	70	Ž	R	128	32	4	8	1	0,06	0,25	0,06	0,06	0	1	0	H
459	35	Ž	R	128	128	16	8	4	2	2	0,06	16	0	1	1	
462	83	Ž	R	128	32	4	8	2	1	1	0,06	1	0	1	0	H
465	72	Ž	N	128	64	128	2	1	16	2	0,5	128	1	1	0	H
468	37	M	Mn	16	8	4	2	1	1	0,06	0,25	0,06	0	1	0	
474	26	Ž	R	4	32	4	1	4	1	1	0,06	1	1	1	0	H
479	43	Ž	R	4	32	2	2	1	0,25	0,25	0,06	0,06	0	1	0	H
483	99	Ž	Mn	4	8	2	2	8	1	1	0,5	8	0	1	0	
484	79	Ž	Mn	128	8	2	1	0,5	0,25	1	0,5	0,06	0	1	0	
490	52	Ž	D	8	8	8	1	8	1	1	0,5	8	0	0	0	H
491	44	Ž	D	128	128	8	1	8	1	2	0,5	8	1	1	0	
492	37	Ž	R	8	8	4	2	2	1	1	0,5	0,125	1	1	0	H
493	76	Ž	N	8	8	4	1	16	2	2	0,5	8	0	0	0	
499	78	Ž	N	8	8	2	1	2	1	1	0,5	8	0	1	0	
502	76	Ž	N	8	8	2	2	4	1	1	0,5	8	1	1	0	

BR	DOB	SPOL	SED	AMX	CF	CXM	GM	CAZ	CTX	CRO	CIP	FEP	pap	Fim	cnf	HEM
503	34	Ž	N	8	8	4	2	4	2	2	0,5	8	0	1	0	H
507	50	Ž	N	8	8	8	2	8	2	2	0,06	8	0	1	0	
511	49	Ž	R	128	64	4	2	1	1	0,5	0,06	0,5	0	1	0	H
515	36	Ž	R	4	8	4	2	0,5	1	0,5	0,06	0,5	1	1	0	
516	24	Ž	D	128	64	4	1	1	0,06	0,25	0,5	1	1	1	0	H
517	1	M	R	128	64	4	2	8	2	2	0,25	8	1	1	0	H
519	13	Ž	N	4	8	2	1	4	1	1	0,06	8	0	1	0	H
521	80	M	D	16	8	2	1	2	1	1	1	8	1	1	0	H
522	54	M	R	128	32	2	1	2	1	1	0,06	0,06	1	1	0	
523	27	M	R	4	8	2	1	4	1	2	0,06	1	1	1	0	H
524	2	M	D	4	8	4	1	8	2	2	0,06	8	1	0	0	H
525	9	Ž	R	128	64	8	1	8	4	8	0,06	8	0	1	1	H
526	26	Ž	R	16	8	4	1	1	0,06	0,25	0,5	0,125	1	1	0	
527	56	Ž	R	128	128	8	1	4	1	1	0,06	8	1	1	1	
528	74	Ž	D	128	64	4	1	1	0,125	0,06	0,06	1	0	0	0	H
529	22	Ž	R	8	8	4	2	8	2	2	0,06	8	1	1	0	
530	77	Ž	R	128	128	4	1	1	0,06	0,25	0,06	0,06	1	0	1	H
531	58	Ž	R	128	128	4	1	8	2	2	0,06	8	1	1	0	H
532	62	Ž	R	16	8	2	1	1	1	0,5	0,06	0,06	0	1	1	
536	76	Ž	N	128	32	16	2	8	4	8	0,5	8	0	1	0	

Tablica 1. Zbirni prikaz rezultata po testiranim sojevima (BR = redni broj soja, M = muški spol, Ž = ženski spol, SED = nalaz sedimenta, R = do 10 leukocita po vidnom polju, N = 10 - 25 leukocita po vidnom polju, D = 25 - 50 leukocita po vidnom polju, Mn = preko 50 leukocita po vidnom polju, AMX = amoksicilin, CF = cefazolin, CXM = cefuroksim, GM = gentamicin, CAZ = ceftazidim, CTX = cefotaksim, CRO = ceftriakson, CIP = ciprofloksacin, FEP = cefipim, *pap* = gen *papC*, *fim* = gen *fimH*, *cnf* = gen *cnf1*, HEM = pojava hemolize na krvnom agaru, 0 = gen prisutan, 1= gen odsutan

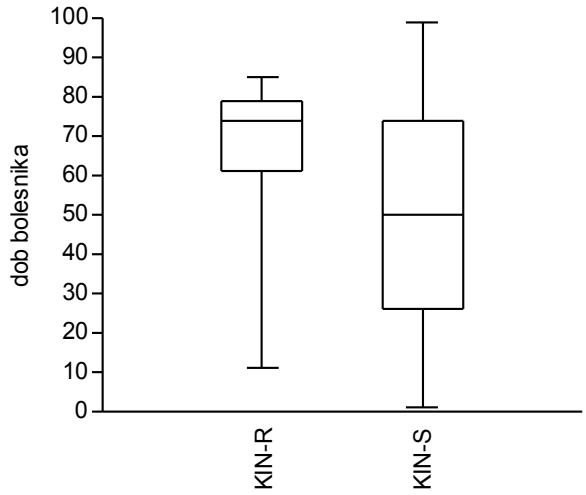
4.1. Usporedba nalaza kod skupine bolesnika s izoliranom *E.coli* otpornom na kinolone s onima kontrolne skupine

4.1.1. Dob i spol bolesnika

Uspoređujući podatke o dobi i spolu bolesnika, željelo se uočiti da li postoje razlike među skupinama.

Kod skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone, od ukupno 87 bolesnika bilo je 19 muškaraca i 68 žena, dok je u kontrolnoj skupini od 87 bolesnika bilo 11 muškaraca i 76 žena. Nije prisutna statistčki značajna razlika u spolu bolesnika među ispitivanim skupinama (χ^2 = 2,57778; p = 0,1084; Fischer-ov egzaktni test p = 0,1567).

U skupini bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone, uočena je slijedeća dobna raspodjela: minimalna životna dob je 11 godina, maksimalna životna dob je 85 godina, dok je medijan 74 godine. U kontrolnoj skupini je minimalna životna dob 1 godina, maksimalna je životna dob 99 godina, a medijan je 50 godina. Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u životnoj dobi među promatranim skupinama (Mann –Whitney U = 2153; z = -4,912; p < 0.0001). Na slici 2 je, pomoću dijagrama s pravokutnikom, prikazana razlika u životnoj dobi među bolesnicima kod kojih je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i bolesnicima kontrolne skupine.



Slika 2. Dijagramom s pravokutnikom (*engl*. box - plot) prikazan je minimum, dvadesetpeti percentil, medijan, sedamdesetpeti percentil te maksimum za životnu dob kod skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone (KIN-R), kao i za kontrolnu skupinu (KIN-S)

4.1.2. Nalaz leukocita u sedimentu urina

Prisustvo leukocita u sedimentu urina predstavlja značajan pokazatelj imunološkog odgovora na infekciju mokraćnoga sustava. Razlika između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine prikazana je u tablici 2. Hi kvadratnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine (χ^2 = 8,4484; p = 0,037598; d.f. = 3).

	KIN-R	KIN-S
do 10 leukocita po vidnom polju	23	38
10 - 25 leukocita po vidnom polju	38	22
25 - 50 leukocita po vidnom polju	17	20
preko 50 leukocita po vidnom polju	9	7

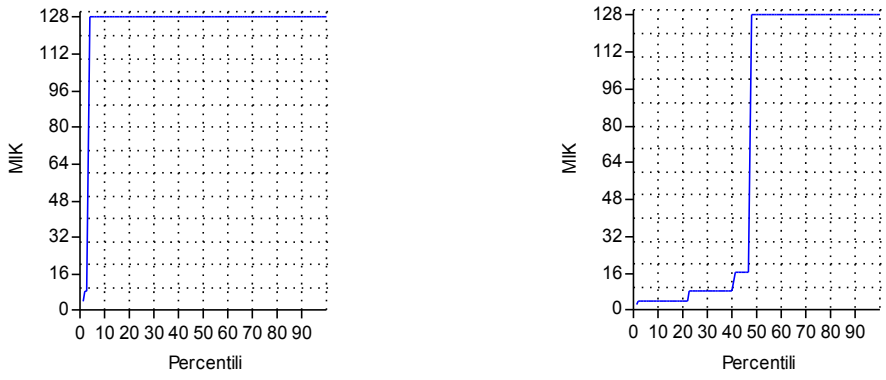
$\chi^2 = 8,4484$; $p = 0,037598$; d.f. = 3

Tablica 2. Raspodjela bolesnika po broju leukocita na vidnom polju (400x) u sedimentu kod skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone (KIN-R) i kod kontrolne skupine (KIN-S)

4.1.3. Osjetljivost na druge antibiotike

4.1.3.1. Amoksicilin

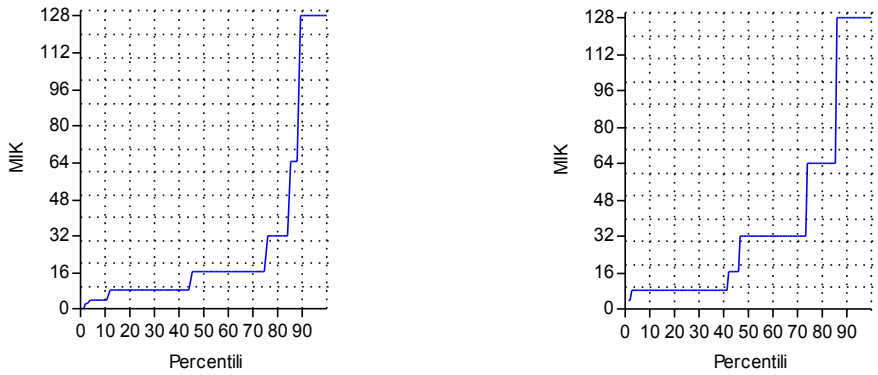
Usporedba osjetljivosti na amoksicilin između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine prikazana je na slici 3. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 128 mg/L, a MIK_{90} 128 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 128 mg/L, a MIK_{90} 128 mg/L . Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na amoksicilin među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 2129; z = -6,538; p < 0.0001).



Slika 3. Raspodjela po percentilima MIK-ova na amoksicilin za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.2. Cefazolin

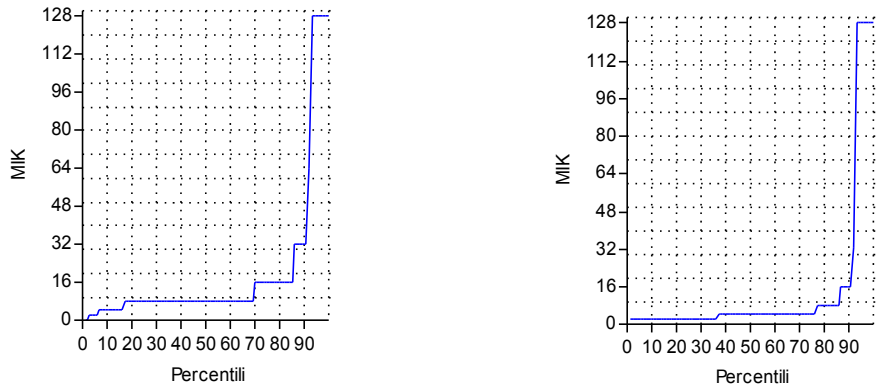
Na slici 4 prikazana je usporedba osjetljivosti na cefazolin između promatranih skupina, koja je dobivena određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 16 mg/L, a MIK_{90} 128 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 32 mg/L, a MIK_{90} 128 mg/L. Postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na cefazolin među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 3019; z = -2,379; p = 0,01736).



Slika 4. Raspodjela po percentilima MIK-ova na cefazolin za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.3. Cefuroksim

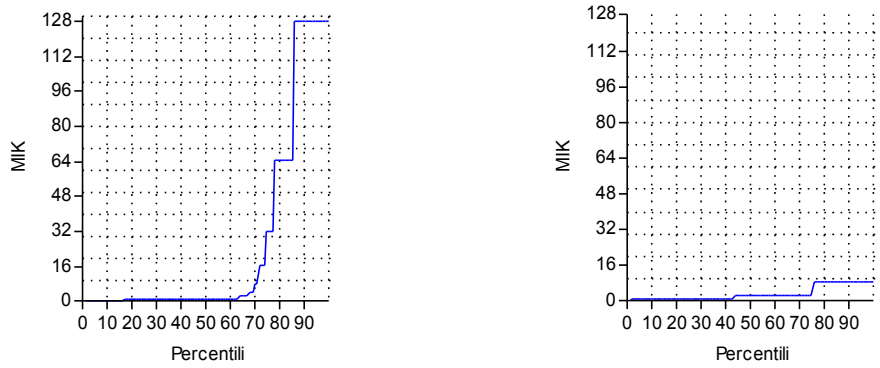
Slika 5 prikazuje usporedbu osjetljivosti na antibiotik cefuroksim između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 8 mg/L, a MIK_{90} 32 mg/L, dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 4 mg/L, a MIK_{90} 16 mg/L. Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na antibiotik cefuroksim među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 1636; z = -6,667; p < 0.0001).



Slika 5. Raspodjela po percentilima MIK-ova na cefuroksim za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.4. Gentamicin

Usporedba osjetljivosti na gentamicin između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine prikazana je na slici 6. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 1 mg/L, a MIK_{90} 128 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 2 mg/L, a MIK_{90} 8 mg/L. Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na gentamicin među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 2998; z = -2,422; p = 0,01545).



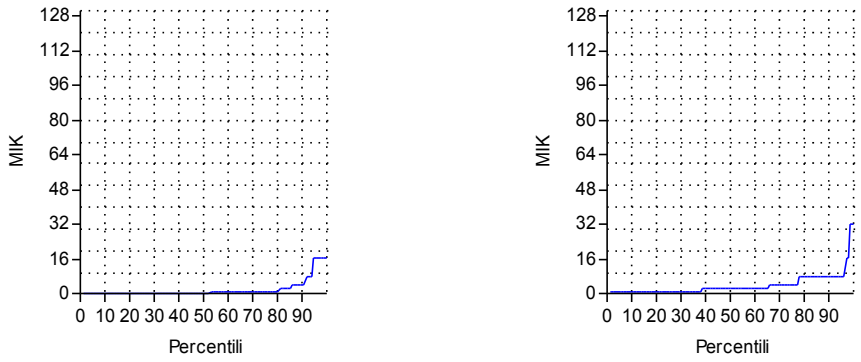
Slika 6. Raspodjela po percentilima minimalnih inhibitornih koncentracija za gentamicin za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.5. Ceftazidim

Na slici 7 prikazana je usporedba osjetljivosti na ceftazidim između promatranih skupina, koja je dobivena određivanjem MIKova.

Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 0,25 mg/L, a MIK_{90} 4 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 2 mg/L, a MIK_{90} 8 mg/L.

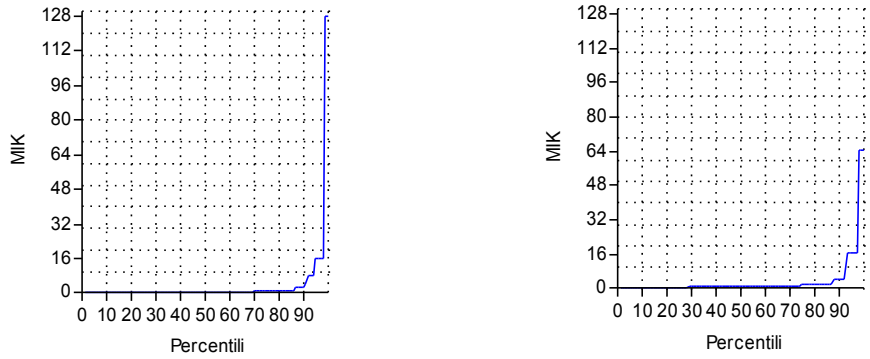
Među promatranim skupinama postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na ceftazidim (Mann–Whitney U = 1301; z = -7,554; p <0.0001).



Slika 7. Raspodjela po percentilima MIK-ova na ceftazidim za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.6. Cefotaksim

Usporedba osjetljivosti na cefotaksim između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine prikazana je na slici 8. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 0,12 mg/L, a MIK_{90} 2 mg/L, dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 1 mg/L, a MIK_{90} 4 mg/L. Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na cefotaksim među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 1921; z = -5,739; p <0.0001).



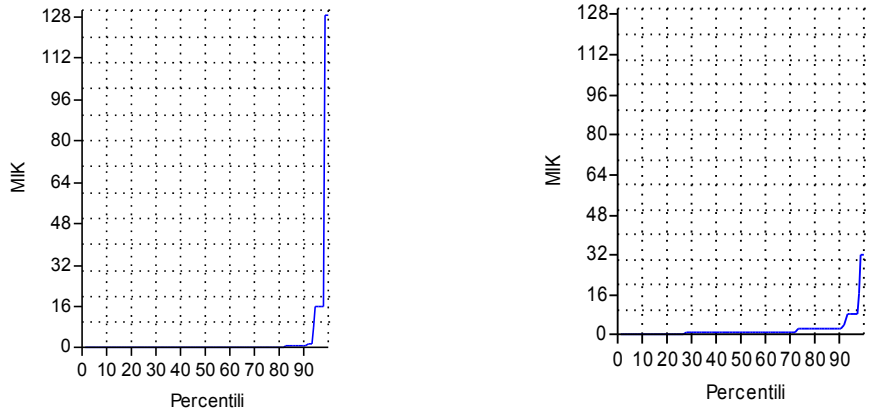
Slika 8. Raspodjela po percentilima MIK-ova na cefotaksim za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.7. Cefriakson

Na slici 9 prikazana je usporedba osjetljivosti na ceftriakson između promatranih skupina, koja je dobivena određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija.

Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 0,06 mg/L, a MIK_{90} 0,5 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 1 mg/L, a MIK_{90} 2 mg/L.

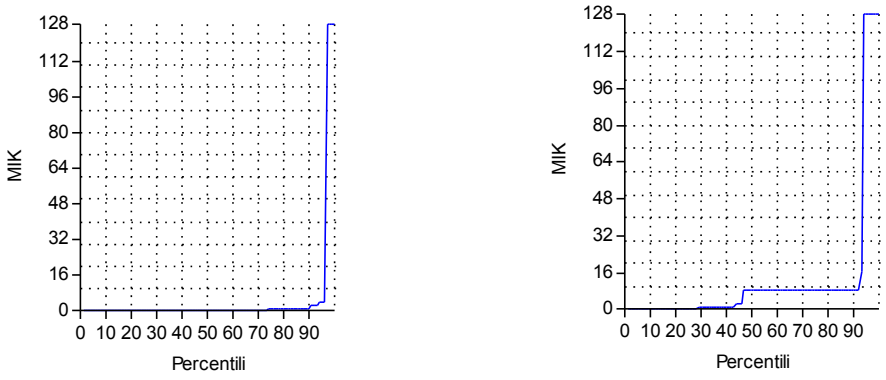
Među promatranim skupinama postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na ceftazidim (Mann–Whitney U = 1151; z = -8,055; p <0.0001).



Slika 9. Raspodjela po percentilima MIK-ova na cefotaksim za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.8. Cefipim

Usporedba osjetljivosti na cefipim između skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone i kontrolne skupine prikazana je na slici 10. Kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone MIK_{50} je bio 0,125 mg/L, a MIK_{90} 1 mg/L , dok je kod kontrolne skupine MIK_{50} bio 8 mg/L, a MIK_{90} 8 mg/L. Mann–Whitney-evim testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u osjetljivosti na cefipim među promatranim skupinama (Mann–Whitney U = 2007; z = -5,44; p <0.0001).



Slika 10. Raspodjela po percentilima MIK-ova na cefipim za skupinu sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (lijevo), kao i za kontrolnu skupinu (desno)

4.1.3.9. Nitrofurantoin

Kod skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone, od ukupno 87 bolesnika bilo je 12 bolesnika s izoliranom *E. coli* otpornom na nitrofurantoin i 75 bolesnika s izoliranom *E. coli* osjetljivom na nitrofurantoin, dok je u kontrolnoj skupini od 87 bolesnika bilo 3 bolesnika s izoliranom *E. coli* otpornom na nitrofurantoin i 84 bolesnika s izoliranom *E. coli* osjetljivom na nitrofurantoin. Među promatranim skupinama postoji statistčki značajna razlika po osjetljivosti na nitrofurantoin (χ^2 = 5,9094; p = 0,01506; Fischer-ov egzaktni test p = 0,02774).

4.1.3.10. Sulfametoksazol/trimetoprim

Kod skupine bolesnika kod koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone, od ukupnog broja od 87 bolesnika bilo je 59 bolesnika s izoliranom *E. coli* otpornom na kombinaciju sulfametoksazola s trimetoprimom i 28 bolesnika s izoliranom *E. coli* osjetljivom na kombinaciju sulfametoksazola s trimetoprimom, dok je u kontrolnoj skupini od 87 bolesnika bilo 25 bolesnika s izoliranom *E. coli* otpornom na kombinaciju sulfametoksazola s trimetoprimom i 62 bolesnika s izoliranom *E. coli* osjetljivom na kombinaciju sulfametoksazola s trimetoprimom. Među promatranim skupinama postoji statistčki značajna razlika po osjetljivosti na kombinaciju sulfametoksazola s trimetoprimom (χ^2 = 26,606; p <0,0001; Fischer-ov egzaktni test p <0,0001).

4.1.3.11. Izlučivanje β-laktamaza proširenog spektra djelovanja

Među izolatima *E. coli* otpornima na kinolone, kao i u kontrolnoj skupini u kojoj su bili izolati *E. coli* osjetljivi na kinolone, nije bilo sojeva koji su proizvodili β-laktamaze proširenog spektra djelovanja.

4.1.4. Činitelji virulencije

4.1.4.1. Proizvodnja hemolizina

Izlučivanje hemolizina promatramo je fenotipski, odnosno po tome da li ispitivani soj stvara hemolizu ovčjih eritrocita na krvnom agaru. Razlika između skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone i kontrolne skupine prikazana je u tablici 3. Hi kvadratnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine (χ^2 = 55,698; p <0,0001; d.f. = 1).

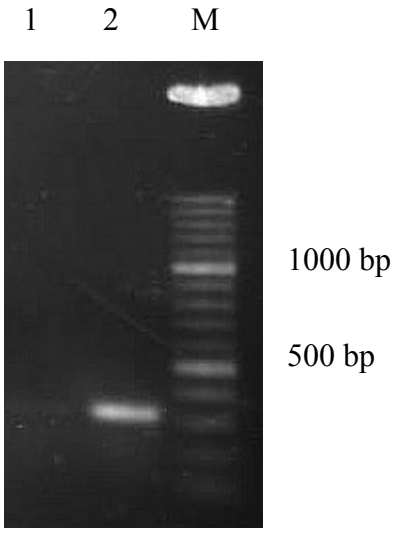
	KIN-R	KIN-S
HEM +	2	46
HEM -	85	41

χ^2 = 55,698; p <0,0001; d.f. = 1

Tablica 3. Izlučivanje hemolizina kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (KIN-R) i kod kontrolne skupine (KIN-S)

4.1.4.2. Prisutnost gena papC

Prisutnost gena *pap* određena je lančanom reakcijom polimeraze, i to za skupinu sojeva *E. coli* koji su bili otporni na kinolone, kao i za kontrolnu skupinu koju su činili sojevi *E. coli* osjetljivi na kinolone. Lančanom reakcijom polimeraze dobiven je produkt veličine 328 bp (slika 11). Razlika između skupina prikazana je na tablici 4. Hi kvadratnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine (χ^2 = 16,939; p <0,0001; d.f. = 1).



Slika 11. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Negativna (stupac 1) i pozitivna (stupac 2) lančana reakcije polimeraze za gen *pap* (M = molekularni marker).

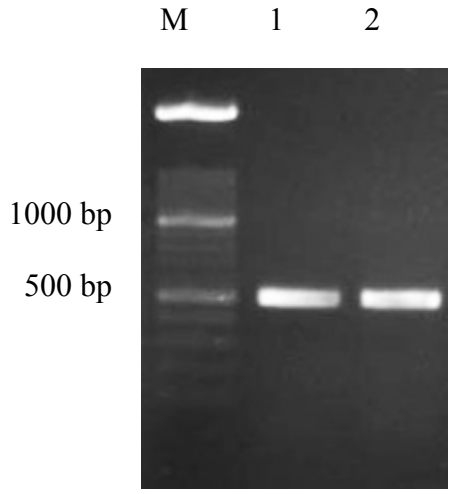
	KIN-R	KIN-S
pap +	18	44
pap -	69	43

χ^2 = 16,939; p <0,0001; d.f. = 1

Tablica 4. Prisutnost gena *pap* kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (KIN-R) i kod kontrolne skupine (KIN-S)

4.1.4.3. Prisutnost gena fimH

Prisutnost gena *fim* određena je lančanom reakcijom polimeraze, i to za skupinu sojeva *E. coli* koji su bili otporni na kinolone, kao iza kontrolnu skupinu koju su činili sojevi *E. coli* osjetljivi na kinolone. Lančanom reakcijom polimeraze dobiven je produkt veličine 508 bp (slika 12). Razlika između skupina prikazana je na tablici 5. Hi kvadratnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine (χ^2 = 84,103; p <0,0001; d.f. = 1).



Slika 12. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Pozitivne (stupci 1 i 2) lančane reakcije polimeraze za gen *fim* (M = molekularni marker).

	KIN-R	KIN-S
fim +	19	79

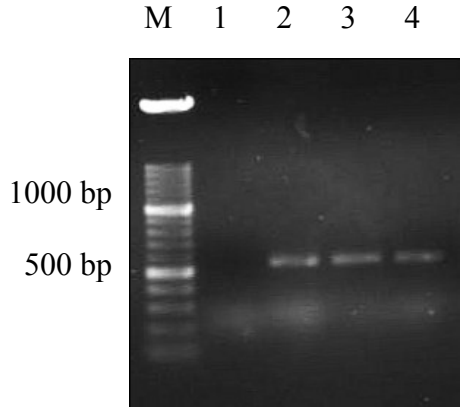
fim -	68	8

χ^2 = 84,103; p <0,0001; d.f. = 1

Tablica 5. Prisutnost gena *fim* kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (KIN-R) i kod kontrolne skupine (KIN-S)

4.1.4.4. Prisutnost gena cnf1

Prisutnost gena *cnf1* određena je lančanom reakcijom polimeraze, i to za skupinu sojeva *E. coli* koji su bili otporni na kinolone, kao iza kontrolnu skupinu koju su činili sojevi *E. coli* osjetljivi na kinolone. Lančanom reakcijom polimeraze dobiven je produkt veličine 498 bp (slika 13). Razlika između skupina prikazana je na tablici 6. Hi kvadratnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine (χ^2 = 8,9506; p = 0,0027738; d.f. = 1).



Slika 13. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Negativna (stupac 1) i pozitivne (stupci 2, 3 i 4) lančane reakcije polimeraze za gen *cnf1* (M = molekularni marker).

	KIN-R	KIN-S
cnf1 +	1	11
cnf1 -	86	76

χ^2 = 8,9506; p = 0,0027738; d.f. = 1

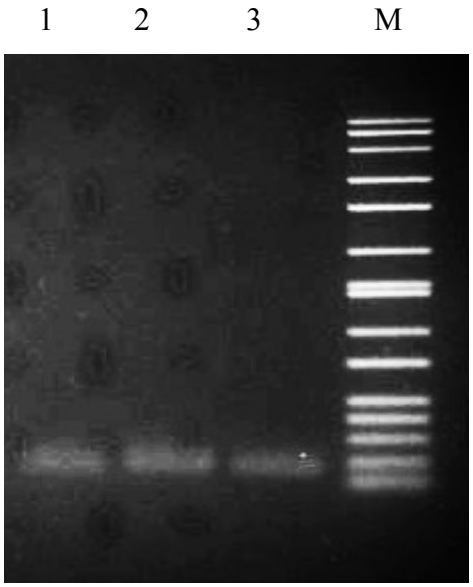
Tablica 6. Prisutnost gena *cnf1* kod skupine sojeva *E. coli* otpornih na kinolone (KIN-R) i kod kontrolne skupine (KIN-S)

4.1.5. Prisutnost plazmidnih gena otpornosti na kinolone qnrA, qnrB i qnrS

Među izolatima *E. coli* koji su bili otporni na kinolone, nije bilo sojeva koji su posjedovali plazmidne gene otpornosti na kinolone *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*.

4.2. Prisutnost mutacija na *gyrA* genu kod sojeva *E.coli* koje su otporne na kinolone

Prisutnost mutacija na na genu *gyrA* određena je metodom praćenja polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimerazom (RFLP-PCR). Mutacije su pronađene kod 79 od 87 testiranih sojeva (90,80%), a po veličini PCR produkta (164 bp) može se zaključiti da se kod svih 79 sojeva radilo o dvije točkaste mutacije na genu *gyrA,* i to zamjena serina na položaju 83 s leucinom, te zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom (slika 14) [188].



Slika 14. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. Metoda praćenja polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimerazom lančane reakcije polimeraze. U stupcima 1, 2 i 3 vidljiv produkt veličine 164 bp, što znači da su prisutne dvije točkaste mutacije na genu *gyrA* na položajima 83 i 87 (M = molekularni marker).

Kako metoda RFLP-PCR može detektirati samo mutacije na položaju 83 i 87, da bi se bolje razjasnila prisutnost mutacija kod otpornih sojeva izvršeno je sekvencioniranje gena *gyrA*, što je napravljeno za reprezentativni broj otpornih izolata. Rezultati sekvencioniranja za pojedine sojeve, zajedno s pripadajućim minimalnim inhibitornim koncentracijama za ciprofloksacin, prikazani su na tablici 7.

Soj br.	MIK za ciprofloksacin	83 serin	87 asparaginska kiselina	106 glicin
11	32			
26	128	leucin	asparagin	
124	16	leucin	asparagin	
125	32	leucin	asparagin	
135	64	leucin		
137	4	leucin		
138	64	leucin	asparagin	
162	128	leucin	asparagin	
167	128	leucin	asparagin	
178	32	leucin	asparagin	arginin
198	4	leucin	asparagin	
203	8	leucin		
209	8			
211	16	leucin	asparagin	

Tablica 7. Zamijenjene aminokiseline na položajima 83, 87 i 106 za 14 sojeva na kojima je provedeno sekvencioniranje gena *gyrA*, te pripadajuće minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin.

4.3. Karakteristike sojeva *E.coli* kojima je inducirana otpornost na kinolone

4.3.1. Osjetljivost na druge antibiotike

Sojevima *E. coli* kojima je inducirana otpornost na kinolone testirana je osjetljivost na druge antibiotike, te su dobiveni rezultati uspoređeni s rezultatima osjetljivosti istih sojeva prije indukcije otpornosti na kinolone.

Rezultati su prikazani na tablici 8 za soj *E. coli* 452, te na tablici 9 za soj *E. coli* 519.

antibiotik	AMX	CF	CXM	GM	CAZ	CTX	CRO	FEP	TZP
MIK prije indukcije (g/ml)	4	8	4	2	2	1	1	8	1
MIK nakon indukcije (g/ml)	4	8	4	8	256	16	32	8	1

Tablica 8. Promjene u minimalnim inhibitornim koncentracijama kod soja *E. coli* 452 prije i nakon indukcije otpornosti na kinolone (AMX amoksicilin, CF cefazolin, CXM cefuroksim, GM gentamicin, CAZ ceftazidim, CTX cefotaksim, CRO ceftriakson, FEP cefipim, TZP piperacilin/tazobaktam).

antibiotik	AMX	CF	CXM	GM	CAZ	CTX	CRO	FEP	TZP
MIK prije indukcije (mg/ml)	4	8	2	1	4	1	1	8	1
MIK nakon indukcije (mg/ml)	4	8	2	32	256	128	64	32	1

Tablica 9. Promjene u minimalnim inhibitornim koncentracijama kod soja *E. coli* 519 prije i nakon indukcije otpornosti na kinolone (AMX amoksicilin, CF cefazolin, CXM cefuroksim, GM gentamicin, CAZ ceftazidim, CTX cefotaksim, CRO ceftriakson, FEP cefipim, TZP piperacilin/tazobaktam).

4.3.2. Prisutnost činitelja virulencije

Sojevima *E. coli* kojima je inducirana otpornost na kinolone određena je prisutnost činitelja virulencije (proizvodnja hemolizina, te prisutnost gena *pap*, *fim* i *cnf1*), te su rezultati uspoređeni sa prisutnošću činitelja virulencije kod istih sojeva prije indukcije otpornosti na kinolone.

Rezultati za soj *E. coli* 452 su prikazani na tablici 10, a za soj *E. coli* 519 na tablici 11.

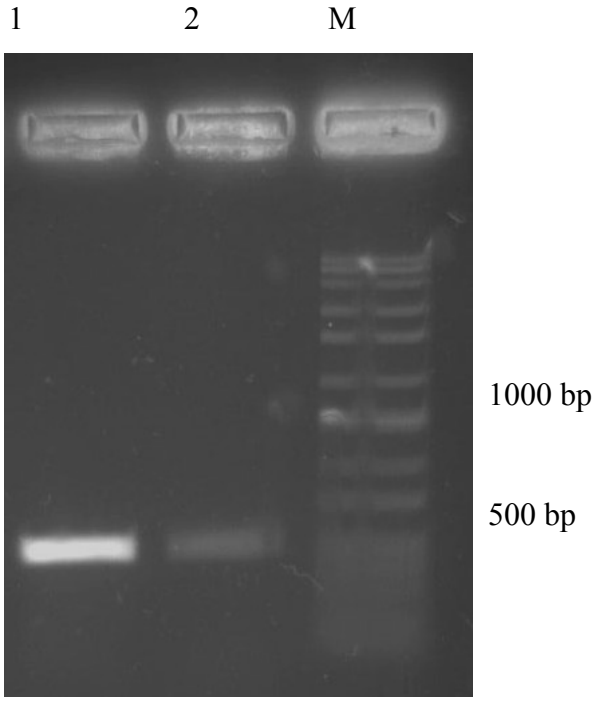
Činitelji virulencije	hemolizin	*pap*	*fim*	*cnf1*
prije indukcije	+	-	+	-
nakon indukcije	+	-	+/-	-

Tablica 10. Promjene u prisutnosti činitelja virulencije kod soja *E. coli* 452 prije i nakon indukcije otpornosti na kinolone.

Činitelji virulencije	hemolizin	*pap*	*fim*	*cnf1*
prije indukcije	+	-	+	-
nakon indukcije	+	-	+	-

Tablica 11. Promjene u prisutnosti činitelja virulencije kod soja *E. coli* 519 prije i nakon indukcije otpornosti na kinolone.

Soj 452 *E. coli* pokazao je manju ekspresiju gena *fim* nakon indukcije otpornosti na kinolone, što je vidljivo na slici 14.



Slika 15. Fotografija agaroznog gela obojenog etidijevim bromidom. U stupcu 1 je soj 452 prije, a u stupcu 2 nakon indukcije otpornosti na kinolone. M je molekularni marker. Vidljivo je smanjenje ekspresije gena *fim*.

4.3.3. Promjene na genu gyrA

Indukcija otpornosti na kinolone uspjela je kod dva soja (*E. coli* 452 i *E. coli* 519). Oba soja s indukcijom otpornosti na kinolone imali su prisutne dvije točkaste mutacije na genu *gyrA* kod koje je serin na položaju 83 zamjenjen s leucinom te mutaciju položaju 87 kod koje je asparaginska kiselina na položaju 87 zamijenjena s asparaginom.

5. Rasprava

Uporaba kinolona je u stalnom porastu, još od vremena njihovog uvođenja u kliničku praksu šezdesetih godina prošloga stoljeća, a naročito nakon 1986. i 1987. godine, kada su sintetizirani snažniji fluorokinoloni norfloksacin i ciprofloksacin [101, 103, 104]. Uz uporabu kinolona u medicini, značajan je porast njihove primjene u veterinarskoj medicini, kao i u akvakulturi [127, 128, 129].

Prije 1990. godine se otpornost *E. coli* na kinolone rijetko zapažala, nakon čega su sve češći izvještaji o porastu otpornosti na tu skupinu antibiotika [123]. Tako je istraživanje provedeno u Spltsko-dalmatinskoj županiji pokazalo da je u petogodišnjem razdoblju (od 1999. do 2004. godine) stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin porasla sa 2,48% na 7,28%, dakle gotovo trostruko [90]. Do sličnih reultata došli su i kineski istraživači, koji su pronašli da je u četverogodišnjem razdoblju od 1998. do 2002. godine stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin porasla sa 46,6% na 59,4% [206].

5.1. Odnos otpornosti na kinolone te dobi i spola bolesnika

Infekcije mokraćnoga sustava se javljaju kod ljudi svake životne dobi i kod oba spola, no znatno su češće kod žena [207]. Odnos otpornosti na kinolone i spola bolesnika je istraživana u španjolskoj studiji, te je utvrđeno da stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin kod muškaraca i žena pokazuje statistički značajnu razliku, te kod muškaraca iznosi 28,9%, a kod žena 19% [208]. U istraživanju provedenom u okviru ovog doktorata pronađeno je da u skupini bolesnika kod

koje je izolirana *E. coli* otporna na kinolone bilo 21,84% muškaraca i 78,16% žena, dok je u kontrolnoj skupini bilo 12,64% muškaraca i 87,36% žena, dakle u skupini kod koje su izolirani sojevi *E. coli* otporni na kinolone bilo je više muškaraca nego u kontrolnoj skupini, no ta se razlika među ispitivanim skupinama po spolu bolesnika nije pokazala statistički značajna (χ^2 = 2,57778; p = 0,1084; Fischer-ov egzaktni test p = 0,1567).

Dob od preko 51 godine života kineski su autori povezali s češćom pojavom otpornosti na ciprofloksacin, što se podudara s rezultatima ovog istraživanja, kod kojega je među bolesnicima s izoliranim sojevima *E. coli* koji su bili otporni na ciprofloksacin bilo prisutno čak 85,06% starijih od 51 godine [209]. Ovakav pomak prema starijoj životnoj dobi uočen je i u španjolskoj studiji, u kojoj je stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin bila sve veća s povećanjem životne dobi bolesnika [208]. Da bi se bolje razumjela ova pojava, potrebno je napomenuti da se kinoloni ne koriste za liječenje osoba mlađih od 18 godina, te to predstavlja glavni razlog zbog čega se rijetko izoliraju bakterije otporne na kinolone kod mlađe populacije. Također, nakon kliničke primjene kinolona potreban je duži vremenski period da se stvore otporne mutante i na taj se način tumači zbog čega je pojava otpornosti na kinolone češće prisutna kod starijih dobnih skupina [123, 153].

5.2. Odnos otpornosti na kinolone i prisutnosti leukocita u sedimentu urina

U dostupnoj literaturi nije bilo moguće pronaći studije koje povezuju otpornost na kinolone sa prisutnošću leukocita u sedimentu urina. U ovom istraživanju utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika (p = 0,037598) među

skupinama, no za ispravno tumačenje ove pojave bilo bi potrebno provođenje dodatnih testiranja koji prelaze okvire ovog rada, a također bi bilo potrebno imati podatke o vrsti infekcije mokraćnoga sustava koja je prisutna kod bolesnika (asimptomatska bakteriurija, cistitis ili pijelonefritis), što zbog nedostatnih podataka o bolesnicima i njihovoj dijagnozi na uputnicama za mikrobiološki laboratorij nije bilo moguće.

5.3. Odnos otpornosti na kinolone i otpornosti na druge antibiotike

Mnoga istraživanja su imala za cilj utvrditi povezanost otpornosti na kinolone s otpornošću na druge antibiotike. Tako je studija provedena u Hong Kongu je pronašla da je među sojevima *E. coli*, uzročnicima cistitisa koji su bili otporni na ciprofloksacin, 94,3% bilo otporno na amoksicilin te 68,6% na kotrimoksazol [209]. Grčka je studija pokazala da su 84% sojeva *E. coli* otpornih na kinolone istovremeno bili otporni i na ampicilin, dok je 68% bilo otporno na kotrimoksazol, za razliku od osjetljivih sojeva kod kojih je stopa otpornosti na ampicilin bila 25% a za kotrimoksazol 2.6% [210]. Također je u istoj studiji pronađena statistički značajna razlika u otpornosti na gentamicin, koja je u skupini otpornoj na kinolone iznosila 28% za razliku od skupine osjetljive na kinolone kod koje je stopa otpornosti na gentamicin bila 0.7% [210]. Navedeni rezultati se potpuno podudaraju s rezultatima istraživanja koje je provedeno prilikom izrade ovoga doktorata. Naime, u ovom istraživanju pokazano je da je među sojevima otpornima na kinolone stopa otpornosti na amoksicilin bila 96,55%, na kotrimoksazol 67,82%, na gentamicin 29,89%, te na ceftazidim 0%, dok je među osjetljivim sojevima kontrolne skupine stopa otpornosti na amoksicilin bila

54,02%, na kotrimoksazol 28,74%, na gentamicin 24,14%, te na ceftazidim 1,15%. Nizozemska studija, koja je obuhvaćala sojeve *E. coli* otporne na ciprofloksacin dobivene iz bolničkih nadzornih kultura, pokazala je da je stopa otpornosti na ceftazidim bila 8%, na kotrimoksazol 86%, te na gentamicin 44%, što predstavlja nešto veću otpornost od rezultata ovog istraživanja, što je posljedica činjenice da su nizozemski istraživači analizirali bolničke sojeve dok su u ovom istraživanju analizirani isključivo izvanbolnički sojevi. [211].

5.4. Odnos otpornosti na kinolone i prisutnosti činitelja virulencije

Prisutnost činitelja virulencije kod sojeva *E. coli* koji uzrokuju infekcije mokraćnoga sustava bila je predmetom mnogih istraživanja u različitim dijelovima svijeta. Naime, već dosta dugo postoje klinička zapažanja da su sojevi *E. coli* otporni na kinolone manje virulentni, te da su češće prisutni među uzročnicima cistitisa i asimptomatske bakteriurije i da se rjeđe javljaju među uzročnicima invazivnih infekcija mokraćnoga sustava kao što su pijelonefritis, prostatitis i febrilna infekcija mokraćnoga sustava [212, 213]. Međutim, u dostupnoj literaturi su rijetka istraživanja koja razlučuju prisutnost činitelja virulencije kod sojeva koji su otporni na kinolone od njihove prisutnosti kod osjetljivih sojeva, dok dominiraju istraživanja vezana za prisutnost činitelja virulencije i vrste infekcije mokraćnoga sustava.

U ovoj studiji, koja je provedena među sojevima *E. coli* koja uzrokuje infekcije mokraćnoga sustava na području Splitsko-dalmatinske županije, pronađeno je da među sojevima osjetljivim na kinolone učestalost gena *fim* bila 90,80%, gena *pap* 50,57% i gena *cnf1* 12,64%, dok je sojeva s hemolizom bilo 52,87%.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su usporedivi s rezultatima istraživanja provedenima u različitim područjima svijeta.

Tako je u studiji provedenoj u SAD (Michigan) uspoređivana učestalost pojedinih činitelja virulencije kod izolata *E. coli* kod različitih skupina bolesnika: kod djece s pijelonefritisom, kod mladih žena sa cistitisom i rekurirajućom infekcijom, kod starijih žena s cistitisom, kao i kod fekalnih izolata. Kod svih skupina je učestalost gena *fim* bila jako visoka (99,3-100%), učestalost gena *pap* bila je od 34,2% kod fekalnih sojeva do 82,4% kod uzročnika pijelonefritisa, gen *cnf1* bio je prisutan od 10% (fekalni sojevi) pa do 40,7% (sojevi uzročnici rekurirajućih infekcija), dok se hemolizinski gen *hly* nalazio u rasponu od 14,9% kod fekalnih uzoraka do 48,2% kod uzročnika rekurirajućih infekcija [76].

U švedskoj studiji je uspoređivana prisutnost činitelja virulencije kod sojeva *E.coli* izoliranih kod muškaraca s febrilnom infekcijom mokraćnoga sustava s rektalnim sojevima iste bakterije. Utvrđeno je da je prevalencija činitelja virulencije veća kod izolata iz urina (*pap* 72%, *hly* 75%, *cnf1* 62%) od one kod rektalnih izolata (*pap* 33%, *hly* 21%, *cnf1* 12%), osim kod gena *fimH* koji je podjednako prisutan u obje skupine izolata (98%:97%) [166, 214].

Slične rezultate donosi i španjolska studija koja uspoređuje prisutnost činitelja virulencije kod sojeva *E.coli* izoliranih kod cistitisa i pijelonefritisa. Gen za fimbrije tipa 1 (*fim*) bio je prisutan kod 90% izolata uzročnika cistitisa i 94% izolata uzročnika pijelonefritisa, geni za hemolizin i citotoksični nekrotizirajući čimbenik 1 (*hly* i *cnf1*) su bili prisutni kod 37% izolata kod cistitisa i 52% izolata kod pijelonefritisa, dok je gen *pap* znatno češće pronađen kod izolata uzročnika pijelonefritisa (52%) nego kod izolata koji su uzrokovali cistitis (11%) [70].

Kineska studija je proučavala činitelje virulencije kod izolata *E. coli* koja uzrokuje infekcije gornjega dijela mokraćnoga sustava. Kod 94% izolata bio je prisutan gen *pap*, kod 92% izolata bio je prisutan gen *fimH*, gen za hemolizin je pronađen kod 45% izolata, dok je gen za citotoksični nekrotizirajući čimbenik 1 pronađen kod 41% izolata [215].

Studija provedena na izolatima *E. coli* od španjolskih bolesnika od cistitisa pokazuje da je gen *papC* pronađen kod 35% izolata kao i kod 76% izolata kod pijelonefritisa, gen *fimH* kod 100% izolata, gen *hlyD* (odgovoran za hemolizin) kod 43% izolata, te gen *cnf1* kod 39% izolata.

Studija provedena u Rumunjskoj je pronašla gen *fimH* kod 86% izolata *E. coli* izoliranih kod infekcija mokraćnoga sustava, gen *pap* kod 36% izolata, gen *hly* kod 23% izolata, te gen *cnf* kod 13% izolata. U studiji su razdvojeni nalazi izolata kod bolničkih i ambulantnih sojeva, pa je pokazano da je učestalost pojave gena *fimH* ista kod ambulantnih i bolničkih sojeva, dok su geni *pap*, *hly* i *cnf* znatno češći kod bolničkih sojeva [216].

Studija provedena u rehabilitacijskom centru za ozljede kralježnice u SAD-u pokazala je da se gen *pap* javlja kod 32% bolesnika sa infekcijom mokraćnoga sustava i kod 27% bolesnika s asimptomatskom bakteriurijom, dok se gen *hly* javlja kod 36% bolesnika sa infekcijom mokraćnoga sustava i kod 21% bolesnika s asimptomatskom bakteriurijom [217].

Studija provedena na urinarnim izolatima *E. coli* s prisutnom α – hemolizom pokazala je da takvi izolati imaju visoku učestalost gena *pap* (89%) i *cnf1* (80%) [198].

Učestalost izolata *E. coli* od bolesnika s infekcijom mokraćnoga sustava s prisutnom hemolizom se, ovisno o provedenim studijama širom svijeta, kreće od 26% do 49% [67].

Podaci iz multicentrične studije francuskih autora pokazuju slijedeću učestalost gena virulencije kod uropatogenih sojeva *E.coli*: *pap* 58%, *hly* 21%, *cnf1* 19% [218].

Sojeve *E. coli* uzročnike urosepse proučavali su autori američke studije iz 1999. godine. Pronađeno je da svi sojevi posjeduju gen *fimH*, gen *papC* posjeduje 77% sojeva, *hlyA* 41%, dok je gen *cnf1* pronađen kod 16% sojeva. Isti su autori pronašli da je prisutnost gena skupine *pap* povezana sa smanjenom otpornošću na antibiotike [219].

Brazilski autori su proučavali prisutnost činitelja virulencije kod sojeva *E. coli* koja uzrokuje cistitis. Oni su pronašli visoku učestalost pojave gena *fimH* (97,5% sojeva), dok se gen *papC* javljao kod 32,7% sojeva, gen *hlyA* kod 25,3% sojeva, a gen *cnf1* kod 18,5% sojeva [220].

U istraživanju provedenom u okviru ovog doktorata među sojevima otpornim na kinolone pronađena je učestalost gena *fim* od 21,84%, gena *pap* 20,69% i gena *cnf1* 1,15%, dok je sojeva s hemolizom je bilo 2,30%. Rezultati su usporedivi s rezultatima španjolske i kanadske studije [66, 221].

U studiji provedenoj u Španjolskoj također se promatrala povezanost pojave hemolize kod sojeva *E. coli* s otpornošću na ciprofloksacin. Utvrđeno je da je među hemolitičnim sojevima znatno manja stopa otpornosti na ciprofloksacin (5,3%) nego među nehemolitičnim sojevima (51,3%) [66]. U istoj studiji je promatrana promjena hemolize kod mutanti s induciranom otpornošću na

ciprofloksacin, te je utvrđeno da prethodno hemolitični sojevi zadržavaju to svojstvo nakon indukcije otpornosti [66]

Kanadska studija je utvrdila postojanje statistički značajne razlike među urinarnim sojevima *E. coli* otpornim na ciprofloksacin i onim osjetljivim na taj antibiotik po hemolizi (4% među otpornima i 76% među osjetljivima) i po prisutnosti gena *pap* (26% među otpornima i 70% među osjetljivima) [221].

Studija provedena s izolatima *E. coli* kod urosepse (izolati iz krvi) pokazala je da se gen *hly* nalazi kod 20% izolata otpornih na kinolone i kod 36% izolata osjetljivih na kinolone, dok se gen *papC* nalazi kod 60% izolata otpornih na kinolone i kod 81% izolata osjetljivih na kinolone [222].

5.5. Prisutnost plazmidnih gena otpornosti na kinolone *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*

U ovom istraživanju među izolatima *E. coli* koji su bili otporni na kinolone, nije bilo sojeva koji su posjedovali plazmidne gene otpornosti na kinolone *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*. Rezultate slične ovima, vrlo rijetku prisutnost plazmidnih gena kod sojeva *E. coli* koji uzrokuju infekcije mokraćnoga sustava, prikazali su i drugi istraživači.

Francuska studija provedena 2005. godine na kolekciji od 185 sojeva enterobakterija koji su bili otporni na kinolone pokazala je da među 117 prikupljenih sojeva *E. coli* otpornih na kinolone nije bilo prisutnosti gena *qnrA*, kao ni gena *qnrS*. Navedeni geni su međutim pronađeni kod 6 sojeva *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Serratia marcescens* iz njihove kolekcije [223].

U Brazilu je na sličan način provedena studija među 257 sojeva entrobakterija koje su bile otporne na kinolone. Od testirana 194 soja *E. coli* otpornih na kinolone nisu bili pronađeni sojevi s genima *qnrA* i *qnrS*, dok bila su prisutna 3 soja s genom *qnrB*. Među ostalim enterobakterijama otpornim na kinolone pronađen je jedino gen *qnrB*, i to kod dva soja *K. pneumoniae* i kod jednog soja *Citrobacter freundii* [224]

U Grčkoj među 113 sojeva *E. coli* otpornih na ciprofloksacin pronađeno je 11 sojeva s genom *qnrS1*, a nisu pronađeni geni *qnrA* i *qnrB*. Svih 11 sojeva s genom *qnrS1* ujedno su imali i mutacije na genima *gyrA* i *parC*, a minimalna inhibitorna koncentracija za ciprofloksacin im se kretala u rasponu od 16 do 128 μg/ml [225].

U Koreji je na prisustvo gena *qnr* testirano 260 sojeva *E. coli*, među kojima su bili sojevi osjetljivi i otporni na ciprofloksacin. Gen *qnr* je pronađen kod samo dva soja, koji su imali minimalnu inhibitornu koncentraciju za ciprofloksacin 1 μg/ml i 8 μg/ml. Soj koji je imao minimalnu inhibitornu koncentraciju 8 μg/ml ujedno je imao i jednu točkastu mutaciju na genu *gyrA*, dok soj s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 1 μg/ml nije imao kromosomskih mutacija koje bi dovodile do otpornosti na kinolone [226].

5.6. Prisustvo mutacija na genu *gyrA* kod sojeva *E. coli* koji su otporni na kinolone

U ovom istraživanju su mutacije na na genu *gyrA* proučavane na dva načina, kod svih sojeva *E. coli* otpornih na kinolone mutacije su određene metodom praćenja polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimerazom (RFLP-PCR) i tako je pronađeno da su mutacije prisutne kod 79

sojeva *E.coli* (90,80%). Potpunije razjašnjenje prisutnosti mutacija kod otpornih sojeva dobiveno je sekvencioniranjem kojim se odredio položaj točkastih mutacija unutar gena *gyrA* na više lokusa, što je napravljeno za reprezentativni broj otpornih izolata.

Sekvencioniranje gena *gyrA* je u ovom istraživanju provedeno na ukupno 14 sojeva *E. coli* otpornih na kinolone, koji su imali minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin u rasponu od 4 do 128 mg/L. Od tog broja, njih tri je imalo samo jednu točkastu mutaciju na položaju 83 gdje je serin zamijenjen leucinom (raspon minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin kod tih sojeva bio je od 4 – 64 mg/L), osam sojeva je imalo dvije točkaste mutacije (zamjena serina na položaju 83 s leucinom, te zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom), dok je jedan soj imao tri točkaste mutacije (zamjena serina na položaju 83 s leucinom, zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom i zamjena glicina s argininom na položaju 106). Soj s tri točkaste mutacije imao je minimalnu inhibitornu koncentraciju za ciprofloksacin 32 mg/L.

Mutacija na položaju 106 (zamjena glicina s argininom) je izuzetno rijetka i dugo se smatralo da kod bakterije *E. coli* može nastati jedino nakon eksperimentalne indukcije otpornosti na kinolone [227, 228]. Ovakva mutacija je 2009. godine opisana u Kuvajtu kod bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhi, koja je izolirana kod dva bolesnika od trbušnoga tifusa [229]. Osim ove neuobičajene i rijetke mutacije, rezultati ovog istraživanja su usporedivi s rezultatima sličnih istraživanja provedenih diljem svijeta, uz ograničenje da se u ovom istraživanju nisu analizirale mutacije na genima *gyrB* i *parC*, niti prisutnost ostalih

mehanizama otpornosti na kinolone (pojačana aktivnost efluksne pumpe, smanjena aktivnost porina).

Tako je analiza 526 tajvanskih izolata *E. coli* pokazala je da 85% sojeva otpornih na kinolone (minimalna inhibitorna koncentracija za ciprofloksacin bila je od 6 do preko 32 mg/L) ima mutacije na genu *gyrA* (serin na položaju 83 zamijenjen je leucinom, a asparaginska kiselina na položaju 87 zamjenjena je s asparaginom), te istovremeno i na genu *parC* (na položaju 80 serin je zamijenjen s izoleucinom) [230].

Španjolski istraživači su proučavali 62 soja *E. coli* s MIK-om za ciprofloksacin u rasponu 0,03-4 mg/L, i svi su imali zamjenu jedne aminokiseline na bjelančevini GyrA, u gotovo 90% slučajeva se radilo o zamijeni serina na položaju 83 s leucinom, a bilo je i sojeva kod kojih je serin bio zamijenjen valinom ili alaninom. Kod nekih sojeva asparaginska kiselina na položaju 87 bila je zamjenjena s asparaginom, tirozinom ili glicinom. Kod sojeva s MIK-om za ciprofloksacin od 4-64 mg/l otkrivene su dvije zamijenjene aminokiseline, kod svih je serin na položaju 83 zamijenjen s leucinom, a druga zamjena je bila na položaju 87 gdje je asparaginska kiselina bila zamjenjena s asparaginom (kod većine sojeva), tirozinom ili histidinom [163].

Japanski autori su u svojoj studiji otkrili da među 182 testirana soja *E. coli* otporna na kinolone samo njih 18,1% ima mutacije na genu *gyrA*, među njima je 10,4% imalo promjenu na položaju serina 83, 4,4% na položaju asparaginske kiseline 87, dok je 3,3% sojeva imalo promjenu i na položaju serina 83 i na položaju asparaginske kiseline 87 [188].

Njemačka studija provedena na 30 bolničkih sojeva *E. coli* otpornih na ciprofloksacin pokazala je da se kod velike većine (27 sojeva) radilo o

dvostrukoj mutaciji (serin 83 → leucin i asparaginska kiselina 87 → asparagin) [231].

Studija koju su Everett i suradnici proveli na argentinskim i španjolskim sojevima *E. coli* otpornima na ciprofloksacin (36 sojeva) pokazala je da svi imaju zamijenu serina na položaju 83 s leucinom, a 26 sojeva ima i dodatno zamijenjenu asparaginsku kiselinu na položaju 87, najčešće s asparaginom, no na tom su položaju kod nekih sojeva pronađeni tirozin, glicin ili histidin [232].

Grčka je studija, izvedena na 170 izolata *E. coli* otpornih na kinolone, pokazala da su mutacije na *gyrA* genu pronađene kod 25 izolata (14,71%), dok su dodatne mutacije na *parC* genu pronađene kod 15 izolata (8,82%). Najčešće zapažene mutacije su bile zamjena serina na položaju 83 s leucinom, te zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom zbog mutacija na genu *gyrA*, te zamjena serina na položaju 80 s izoleucinom zbog mutacija na genu *parC* [210].

Studija koju su Jimenez Gomez i suradnici proveli na izolatima *E. coli* otpornima na kinolone, uzročnicima septikemije kod divljih ptica, pokazala je da svi izolati imaju mutaciju na genu *gyrA*, koja je dovela do zamjena serina na položaju 83 s leucinom. Svih devet testiranih izolata imalo je MIK za ciprofloksacin 1-2 mg/L, a nisu zapažene dodatne točkaste mutacije na genu *gyrA*, kao ni mutacije ostalih gena odgovornih za nastanak otpornosti na kinolone (*gyrB*, *parC* i *parE*) [233].

Urinarni izolati *E. coli* otporni na kinolone su analizirani u španjolskoj studiji iz 1994. godine. Studija je pokazala da izolati s MIK-om za ciprofloksacin od 0,25-4 mg/L imaju jednu mutaciju na *gyrA* genu koja dovodi do zamjena serina na položaju 83 s leucinom, a ukoliko je MIK za ciprofloksacin od 8-128 mg/L uz

zamjenu serina na položaju 83 postoji još i zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s tirozinom odnosno s asparaginom [234].

Do ponešto različitih rezultata su došli brazilski istraživači. Njihova studija je pokazala da izolati *E. coli* s MIK-om za ciprofloksacin od 0,12-0,25 mg/L imaju jednu mutaciju na *gyrA* genu (zamjena serina na položaju 83 s leucinom), dok ukoliko je MIK za ciprofloksacin bio u rasponu od 4-64 mg/L, uz zamjenu serina na položaju 83 postojala je još i zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom. Sojevi s MIK-om od 4-64 mg/L imali su još i jednu mutaciju na genu *parC* (zamjena serina na položaju 80 s izoleucinom) [119].

Od 56 izolata *E. coli*, uzročnika ptičje kokobaciloze, koji su imali MIK za ciprofloksacin od 0,12 do 8 mg/L, velika većina (njih 40) je imala jednu točkastu mutaciju na genu gyrA (serin 83 → leucin na položaju 83), dok su ostali sojevi imali po jednu mutaciju na genu *gyrA* položaju 87 te dodatnu točkastu mutaciju na genima *gyrB* i *parC*. Posebnost ove studije je u tome što su većina sojeva, bez obzira na prisutnu mutaciju, zadržali osjetljivost na ciprofloksacin, jer je samo 5% od 56 sojeva s mutacijom bilo otporno na taj antibiotik [235].

Korejski autori su proučavali kokošje izolate *E. coli* i među 72 izolata otporna na ciprofloksacin pronašli su da svi oni posjeduju dvije mutacije na genu *gyrA*, sa zamjenama na poziciji 83 i na poziciji 87 [236].

5.7. Karakteristike sojeva *E.coli* kojima je inducirana otpornost na kinolone

U ovom istraživanju je indukcija otpornosti na kinolone uspjela na dva soja *E. coli* koja uzrokuju infekcije mokraćnoga sustava. Zbog malog broja induciranih sojeva teško je donositi opće zaključke, no slične su rezultate imali i autori

ostalih istraživanja kod kojih je rađena indukcija otpornosti na kinolone. Svim dostupnim objavljenim radovima je zajedničko da je indukcija bila uspješna kod vrlo malog postotka testiranih sojeva. Oba soja iz ovog istraživanja proizvodila su hemolizin prije indukcije, te su to svojstvo zadržali i nakon induciranja otpornosti na kinolone. Gen *pap* nije bio prisutan ni kod jednog soja prije indukcije, a to se zadržalo i nakon indukcije otpornosti na kinolone. Isto je bilo s genom *cnf1* koji nije bio prisutan prije indukcije otpornosti i to se nije promijenilo nakon indukcije otpornosti. Gen *fim* je bio prisutan kod oba soja prije indukcije i kod jednog soja je ostao prisutan nakon indukcije otpornosti na kinolone, dok je kod drugog soja njegova ekspresija bila smanjena. U pogledu osjetljivosti na ostale antibiotike prije i poslije indukcije otpornosti na kinolone, u ovom istraživanju je otkriveno da su oba soja s induciranom otpornošću na kinolone stekla povećanu otpornost na cefalosporine treće generacije ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson, te antibiotik gentamicin. Jedan od dva inducirana soja stekao je otpornost i na antibiotik cefipim. Oba soja s indukcijom otpornosti na kinolone imali su prisutne dvije točkaste mutacije na genu *gyrA* kod kojih je serin na položaju 83 zamjenjen s leucinom, a asparaginska kiselina na položaju 87 s asparaginom.

Navedeni rezultati su usporedivi s rezultatima istraživanja provedenima širom svijeta.

Tako su Tavio i suradnici na ograničenom broju sojeva *E. coli* proveli indukciju otpornosti na kinolone i nakon toga promatrali karakteristike dobivenih sojeva kao i otpornost na ostale antibiotike. Od 18 testiranih sojeva svi su stekli mutaciju na genu *gyrA*, kod 14 sojeva je serin na položaju 83 zamjenjen s leucinom, kod jednoga soja je zamijenjen s valinom, a kod jednog s leucinom.

Kod dva soja je asparaginska kiselina na položaju 87 zamjenjena s asparaginom. Jedan soj je imao i drugu točkastu mutaciju, i to na genu *parC*, gdje je na položaju 80 serin zamijenjen s argininom. Uz mutacije koje utječu na DNA girazu, svi inducirani sojevi imali su i smanjen unos kinolona u stanicu, bilo zbog smanjene aktivnosti porina, bilo zbog pojačane aktivnosti efluksne pumpe. Svi sojevi kojima je inducirana otpornost na kinolone pokazali su istovremeno i povećani stupanj otpornosti na cefalotin i tetracikline [159].

Američki su autori još 1986. godine utvdili da indukcija otpornosti na norfloksacin dovodi do povećanja otpornosti putem dva mehanizma, jedan je točkasta mutacija u genu *gyrA*, dok je drugi mehanizam vezan za smanjenje aktivnosti porina te je uz kinolone povećana stopa otpornosti i na tetracikline, kloramfenikol i cefoksitin [237].

Soto i suradnici su inducirali otpornost na kinolone samo tri soja *E. coli* njihovim izlaganjem subinhibitornim koncentracijama ciprofloksacina. Sva tri soja su nakon indukcije izgubili gene *hlyA* i *cnf1*, dok je jedan soj izgubio još i gen *sat1*, gen odgovoran za nastanak autotransporterskog toksina [83].

Na referentnim sojevima *E. coli*, kao i izraelskim sojevima *E. coli* koji su izolirani kod bolesnika s cistitisom inducirana je otpornost na kinolone, i to nalidiksičnom kiselinom pa zatim ciprofloksacinom. Analiza činitelja virulencije prije i nakon indukcije otpornosti pokazala je da je samo kod jednog soja (izraelskog soja uzročnika cistitisa) došlo do gubitka jednog činitelja virulencije i to gena *ompT*, odgovornog za sintezu proteaze T vanjske membrane *E. coli*. Ostali testirani činitelji virulencije, njih 40, medu kojima su bili i geni *cnf1*, *fimH*, *hly*, *papG*, nisu nestali prigodom induciranog prelaska sojeva osjetljivih na kinolone u otporne sojeve [238]

Dva hemolitična soja *E. coli* osjetljiva na ciprofloksacin su korištena u španjolskoj studiji i njima je inducirana otpornost na ciprofloksacin. Nakon indukcije se svojstvo hemolize nije izgubilo, iako je u istoj studiji utvđeno da je stopa otpornosti na ciprofloksacin kod nehemolitičnih sojeva bila znatno veća (51,3%) od stope otpornosti kod hemolitičnih sojeva (5,3%) [66].

6. Zaključci

Temeljem rezultata istraživanja, mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Porast otpornosti bakterije *E. coli* na kinolonske antibiotike predstavlja sve veći javnozdravstveni problem, kako u svijetu, tako i kod nas.
2. Među bolesnicima s infekcijom mokraćnoga sustava kod kojih su izolirani sojevi *E. coli* otporni na kinolone bilo je nešto više muškaraca nego u kontrolnoj skupini (21,84%:12,64%), no ta se razlika nije pokazala statistički značajna
3. Stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin raste s povećanjem životne dobi bolesnika. Među bolesnicima s izoliranim sojevima *E. coli* otpornim na ciprofloksacin bilo je 85,06% starijih od 51 godine.
4. Sojevi otporni na kinolone pokazuju veću otpornost na ostale antibiotike. Tako je među sojevima otpornima na kinolone stopa otpornosti na amoksicilin bila 96,55%, na kotrimoksazol 67,82%, te na gentamicin 29,89%, za razliku od osjetljivih sojeva kontrolne skupine među kojima je stopa otpornosti na amoksicilin bila 54,02%, na kotrimoksazol 28,74%, te na gentamicin 24,14%.
5. Činitelji virulencije su značajno rjeđe pronađeni kod sojeva otpornih na kinolone (gen *fim* 21,84%, gen *pap* 20,69%, gen *cnf1* 1,15%, hemoliza 2,30%) nego među sojevima osjetljivima na kinolone (gen *fim* 90,80%, gen *pap* 50,57%, gen *cnf1* 12,64%, hemoliza 52,87%).

6. Među izolatima *E. coli* otpornima na kinolone, kao i u kontrolnoj skupini izolata *E. coli* osjetljivih na kinolone, nije bilo sojeva koji su posjedovali plazmidne gene otpornosti na kinolone (*qnrA*, *qnrB* i *qnrS*).
7. Mutacije na *gyrA* genu na pozicijama 83 i 87 bile su prisutne kod 90,80% sojeva *E. coli* otpornih na kinolone
8. Sekvencioniranjem gena *gyrA* kod sojeva *E. coli* otpornih na kinolone određeno je da su najčešće mutacije na položaju 83 (serin → leucin) i na položaju 87 (asparaginska kiselina → asparagin). Kod jednog testiranog soja otkrivena je izuzetno rijetka mutacija na položaju 106 (glicin → arginin), za koju se dugo smatralo da može nastati jedino nakon indukcije otpornosti na kinolone u eksperimentalnim uvjetima.
9. Indukcija otpornosti na kinolone uspjela je na dva soja *E. coli*. Sojevi su nakon indukcije zadržali svojstvo izlučivanja hemolizina, kod jednog soja je gen *fim* ostao prisutan i nakon indukcije, dok je kod drugog soja je njegova ekspresija bila smanjena. Sojevi nisu posjedovali gene *pap* i *cnf1* ni prije, a ni nakon indukcije otpornosti na kinolone.
10. Sojevi s induciranom otpornošću na kinolone stekli su povećanu otpornost na cefalosporine treće generacije ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson, te antibiotik gentamicin. Jedan od dva inducirana soja stekao je otpornost i na antibiotik cefipim.
11. Oba soja kojima je inducirana otpornost na kinolone stekli su dvije točkaste mutaciju na genu *gyrA* (zamjena serina na položaju 83 s leucinom i zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom).

7. Sažetak

Infekcije mokraćnoga sustava se ubrajaju među najčešće infekcije kod ljudi, a bakterija *Escherichia coli* je njihov glavni uzročnik. Pretjerana i nekontrolirana uporaba kinolona dovodi do sve veće otpornosti bakterija na tu skupinu antibiotika. Mehanizmi otpornosti bakterija na kinolone uključuju promjenu ciljne molekule za lijek, pojačanu aktivnost efluksne pumpe i promjenu propusnosti stanične membrane zbog smanjene aktivnosti porina.

Cilj istraživanja je bilo steći uvid u karakteristike sojeva uropatogene *E. coli* otporne na kinolone s obzirom na molekularne mehanizme otpornosti, prisutnost činitelja virulencije i otpornost na ostale antibiotike, te utvrditi razliku u odnosu na karakteristike sojeva koji su osjetljivi na kinolone. Također je bio cilj utvrditi koliko laboratorijski inducirana otpornost na kinolone kod prethodno osjetljivih sojeva mijenja ostale karakteristike sojeva.

Tijekom jednogodišnjeg razdoblja su se iz uzoraka urina, dobivenih od izvanbolničkih bolesnika sa simptomima infekcije mokraćnog sustava sa područja Splitsko-dalmatinske županije, izolirali svi sojevi *E. coli* otporni na kinolone. Kontrolna se skupina formirala tako da se za svaki soj otporan na kinolone uzeo slijedeći izolirani bolesnički soj *E. coli* koji je bio osjetljiv na kinolone.

U skupini kod koje su izolirani sojevi *E. coli* otporni na kinolone bilo je više muškaraca nego u kontrolnoj skupini, no ta se razlika nije pokazala statistički značajnom. Zapaženo je da stopa otpornosti *E. coli* na ciprofloksacin raste s povećanjem životne dobi bolesnika, pa su tako otporni sojevi češće izolirani kod starijih bolesnika. Sojevi otporni na kinolone pokazuju veću otpornost na ostale

antibiotike. Tako je među sojevima otpornima na kinolone stopa otpornosti na amoksicilin bila 96,55%, na kotrimoksazol 67,82%, te na gentamicin 29,89%, za razliku od osjetljivih sojeva kod kojih je stopa otpornosti na amoksicilin bila 54,02%, na kotrimoksazol 28,74%, te na gentamicin 24,14%. Činitelji virulencije su znatno rjeđe pronađeni kod sojeva otpornih na kinolone (gen *fim* 21,84%, gen *pap* 20,69%, gen *cnf1* 1,15%, hemoliza 2,30%) nego kod sojeva osjetljivih na kinolone (gen *fim* 90,80%, gen *pap* 50,57%, gen *cnf1* 12,64%, hemoliza 52,87%). Među izolatima *E. coli* otpornima na kinolone nije bilo sojeva koji su posjedovali plazmidne gene otpornosti na kinolone (*qnrA*, *qnrB* i *qnrS*). Mutacije na genu *gyrA* na pozicijama 83 i 87 bile su prisutne kod 90,80% sojeva *E. coli* otpornih na kinolone. Sekvencioniranjem gena *gyrA* kod sojeva *E. coli* otpornih na kinolone određeno je da su najčešće mutacije na položaju 83 (serin → leucin) i na položaju 87 (asparaginska kiselina → asparagin). Kod jednog testiranog soja otkrivena je izuzetno rijetka mutacija na položaju 106 (glicin → arginin), za koju se dugo smatralo da može nastati jedino nakon indukcije otpornosti na kinolone u eksperimentalnim uvjetima.

Indukcija otpornosti na kinolone uspjela na dva soja *E. coli*. Sojevi su nakon indukcije zadržali svojstvo izlučivanja hemolizina, kod jednog soja je gen *fim* ostao prisutan i nakon indukcije, dok je kod drugoga njegova ekspresija bila smanjena. Sojevi nisu posjedovali gene *pap* i *cnf1* ni prije, a ni nakon indukcije otpornosti na kinolone. Sojevi s induciranom otpornošću na kinolone stekli su povećanu otpornost na cefalosporine treće generacije ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson, te na antibiotik gentamicin, a jedan je soj stekao otpornost i na antibiotik cefipim. Oba soja kojima je inducirana otpornost na kinolone stekli su

dvije točkaste mutacije na genu *gyrA* (zamjena serina na položaju 83 s leucinom i zamjena asparaginske kiseline na položaju 87 s asparaginom).

8. Summary

Urinary tract infecions are among most frequent human infections and *Escherichia coli* is their main cause. Uncontrolled use of quinolones leads to resistance to this group of antibiotic. Quinolone-resistance mechanisms include modification of drug target molecule, increased activity of the eflux pump and changing of cell membrane permeability due to decreased activity of porins.

Aim of this study was to get an insight of characteristics of quinolone-resistant *E. coli*, taking into cosnsideration the molecular mechanisms of resistance, presence of virulence factors and resistance to other antibiotics, as well as to a determine difference in characteristics of strains that are quinolone-susceptible. Another aim was to determine how much the laboratory-induced quinolone-resistance in previously susceptible strains was changing the other strain characteristics.

During one year period all quinolone-resistant *E. coli* strains were isolated from urine samples obtained from out-patients with symptoms of urinary tract infections in the Split and Dalmatia County. Control group was formed by taking the next isolated quinolone-susceptible strain of *E. coli* for each quinolone-resistant strain.

In the group where the strains of quinolone resistant *E. coli* were isolated, there wasa higher percentageof males than in control group, but this difference was not significant. It was observed that resistance rate of *E. coli* to ciprofloxacin increases with age of patients and resistant strains were more frequently isolated in elder patients. Strains resistant to quinolones show higher resistance to other antibiotics. Among the quinolone-resistant strains the resistance rate to

amoxicillin was 96.55%, to cotrimoxazole 67.82%, and to gentamicin 29.89%, in contrast to sensitive strains where the resistance rate to amoxicillin was 54.02%, to cotrimoxazole 28.74% and to gentamicin 24.14%. Virulence factors were found significantly less frequently in quinolone-resistant strains (*fim* gene in 21.84%, *pap* gene in 20.69%, *cnf1* gene in 1.15% and hemolysis in 2.30%) than in quinolone-sensitive strains (*fim* gene in 90,80%, *pap* gene in 50.57%, *cnf1* gene in 12.64% and hemolysis in 52.87%). Among quinolone-resistant *E. coli* isolates, there were no strains with plasmid quinolone-resistance genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*). Mutations in the *gyrA* gene at positions 83 and 87 were present in 90.80% strains of quinolones resistant *E. coli*. Sequencing of *gyrA* gen in quinolones resistant *E. coli* strains showed that the most common mutation were at position 83 (serine → leucine) and at position 87 (aspartic acid → asparagine). In one tested strain extremely rare mutation at position 106 (glycine → arginine) was detected, which has long been thought to be formed only after the induction of quinolone-resistance in experimental conditions.

Induction of quinolone-resistance was successful in two *E. coli* strains. After the induction, strains kept the secretion of hemolysin. In one strain, the *fim* gene remained present after induction, while in the other its expression was reduced. The strains have no *pap* and *cnf1* genes neither before nor after the induction of quinolone-resistance. Strains with induced resistance to quinolones have gained increased resistance to third generation cephalosporins ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone, as well as to gentamicin, while one strain acquired resistance to cefipime. Both strains with induced quinolone-resistance have gained two points mutation in the *gyrA* gene (replacement of serine at position

83 with leucine and replacement of aspartic acid at position 87 with asparagine).

9. Popis literature

1. Hooton TM, Scholes D, Gupta K, Stapleton AE, Roberts PL, Stamm WE. Amoxicillin-clavulanate vs ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated cystitis in women: a randomized trial. JAMA. 2005;293:949-55.

2. Cavallone D, Malagolini N, Monti A, Wu XR, Serafini-Cessi F. Variation of high mannose chains of Tamm-Horsfall glycoprotein confers differential binding to type 1-fimbriated *Escherichia coli*. J Biol Chem. 2004;279:216-22.

3. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Kaliterna V, Carev M. Urinary tract infections in South Croatia: Aetiology and antimicrobial resistance. Int J Antimicrob Agents. 2003;22 Suppl. 2:61-4.

4. Schlager TA, Ashe KM, Hendley JO. The ability of periurethral Escherichia coli to grow in a voiding system is a key for the dominance of *E. coli* cystitis. Microb Pathog. 1997;22:235-40.

5. Arslan H, Azap OK, Ergonul O, Timurkaynak F; Urinary Tract Infection Study Group. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. J Antimicrob Chemother. 2005;56:914-8.

6. Hughes C, Hacker J, Roberts A, Goebel W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Infect Immun. 1983;39:546-51.

7. Giamarellou H. Uncomplicated urinary tract infections. Nephrol Dial Transplant. 2001;16 Suppl 6:129-31.

8. Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. J Antimicrob Chemother. 2000 Sep;46 Suppl 1:1-7.

9 Johnson JR, Scheutz F, Ulleryd P, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Sandberg T. Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection. J Clin Microbiol. 2005;43:3895-3900.

10. Foxman B, Manning SD, Tallman P, Bauer R, Zhang L, Koopman JS, Gillespie B, Sobel JD, Marrs CF. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal E. coli to be shared between heterosexual sex partners. Am J Epidemiol. 2002;156:1133-40.

11. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. Am J Epidemiol. 2001;153:1135-41.

12 Franz M, Horl WH. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. I: Pathophysiology and diagnostic techniques. Nephrol Dial Transplant. 1999;14:2746-53.

13. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2000;38:53-66.

14. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett. 2005;252:183-90.

15. Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. Prevention of catheter-associated urinary tract infection. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:37-41.

16. Johnson DE, Russell RG, Lockatell CV, Zulty JC, Warren JW. Urethral obstruction of 6 hours or less causes bacteriuria, bacteremia, and pyelonephritis in mice challenged with "nonuropathogenic" *Escherichia coli*. Infect Immun. 1993;61:3422-8.

17. Arthur M, Johnson CE, Rubin RH, Arbeit RD, Campanelli C, Kim C, Steinbach S, Agarwal M, Wilkinson R, Goldstein R. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1989;57:303-13.

18. Connell H, Hedlund M, Agace W, Svanborg C. Bacterial attachment to uro-epithelial cells: mechanisms and consequences. Adv Dent Res. 1997;11:50-8.

19. Krieger JN. Urinary tract infections: what's new? J Urol. 2002;168:2351-8.

20. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. Infect Immun. 2004;72:6373-81.

21. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. Traffic. 2005;6:18-31.

22. Devuyst O, Dahan K, Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:1290-4.

23. Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. J Biol Chem. 2001;276:9924-30.

24. Bastos AC, Santos LB, Tamashiro WM, Yamada AT, Oliveira UM, Yano T. Role of Tamm-Horsfall protein in the binding and in vivo phagocytosis of type 1 fimbriated *Escherichia coli* by mouse peritoneal macrophages. Braz J Med Biol Res. 2001;34:913-7.

25. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Virulence factors of uropathogens. Curr Opin Urol. 2002;12:33-8.

26. Scholes D, Hooton TM, Roberts PL, Stapleton AE, Gupta K, Stamm WE. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. J Infect Dis. 2000;182:1177-82. []

27. Scholes D, Hooton TM, Roberts PL, Stapleton AE, Gupta K, Stamm WE. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. J Infect Dis. 2000;182:1177-82.

28. Franz M, Horl WH. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. II: clinical management. Nephrol Dial Transplant. 1999;14:2754-62.

29. McMurdo ME, Bissett LY, Price RJ, Phillips G, Crombie IK. Does ingestion of cranberry juice reduce symptomatic urinary tract infections in older people in hospital? A double-blind, placebo-controlled trial. Age Ageing. 2005;34:256-61.

30. Raz R, Chazan B, Dan M. Cranberry juice and urinary tract infection. Clin Infect Dis. 2004;38:1413-9.

31. Johnson BJ, Lin B, Dinderman MA, Rubin RA, Malanoski AP, Ligler FS. Impact of cranberry on *Escherichia coli* cellular surface characteristics. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:992-4.

32. Reid G, Hsiehl J, Potter P, Mighton J, Lam D, Warren D, Stephenson J. Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. Spinal Cord. 2001;39:26-30.

33. Sandberg T, Kaijser B, Lidin-Janson G, Lincoln K, Orskov F, Orskov I et al. Virulence of *Escherichia coli* in relation to host factors in women with symptomatic urinary tract infection. J Clin Microbiol. 1988;26:1471-6.

34. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol Rev. 1989;53:210-30.

35. da Silveira WD, Benetti F, Lancellotti M, Ferreira A, Solferini VN, Brocchi M. Biological and genetic charasteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Rev Inst Med Trop S Paulo 2001;43:303-10.

36. Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Janson G, Lindberg U, Svanborg Edén C. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Infect Immun. 1981;31:564-70.

37. Kao JS, Stucker DM, Warren JW, Mobley HL. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. Infect Immun. 1997;65:2812-20.

38. Johnson DE, Lockatell CV, Russell RG, Hebel JR, Island MD, Stapleton A, Stamm WE, Warren JW. Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. Infect Immun. 1998;66:3059-65.

39. Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. J Clin Microbiol. 2003;41:337-45.

40. Duncan MJ, Mann EL, Cohen MS, Ofek I, Sharon N, Abraham SN. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. J Biol Chem. 2005;280:37707-16.

41. Parkkinen J, Virkola R, Korhonen TK. Identification of factors in human urine that inhibit the binding of *Escherichia coli* adhesins. Infect Immun. 1988;56:2623-30.

42. Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. J Bacteriol. 2004;186:1249-57.

43. Struve C, Krogfelt KA. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. Microbiology. 1999;145:2683-90.

44. Leathart JB, Gally DL. Regulation of type 1 fimbrial expression in uropathogenic *Escherichia coli*: heterogeneity of expression through sequence changes in the *fim* switch region. Mol Microbiol. 1998;28:371-81.

45. Schembri MA, Kjaergaard K, Sokurenko EV, Klemm P. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. J Infect Dis. 2001;183 Suppl 1:S28-31.

46. Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. J Infect Dis. 2001;183 Suppl 1:S36-40.

47. Snyder JA, Haugen BJ, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, Welch RA, Mobley HL. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2005;73:7588-96.

48. Roe AJ, Currie C, Smith DG, Gally DL. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. Microbiology. 2001;147:145-52.

49. Schembri MA, Sokurenko EV, Klemm P. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. Infect Immun. 2000;68:2638-46.

50. Stamm WE. Theodore E. Woodward Award: host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2006;117:75-83;

51. Abraham S, Shin J, Malaviya R. Type 1 fimbriated *Escherichia coli*-mast cell interactions in cystitis. J Infect Dis. 2001;183 Suppl 1:S51-5. []

52. Connell H, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:9827-32.

53. Virkola R, Westerlund B, Holthofer H, Parkkinen J, Kekomaki M, Korhonen TK. Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. Infect Immun. 1988;56:2615-22.

54. Xia Y, Gally D, Forsman-Semb K, Uhlin BE. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. EMBO J. 2000;19:1450-7.

55. Goluszko P, Moseley SL, Truong LD, Kaul A, Williford JR, Selvarangan R, Nowicki S, Nowicki B. Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the *dra* region prevented tubulointerstitial nephritis. J Clin Invest. 1997;99:1662-72.

56. Nowicki B, Truong L, Moulds J, Hull R. Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Am J Pathol. 1988;133:1-4.

57. Goluszko P, Goluszko E, Nowicki B, Nowicki S, Popov V, Wang HQ. Vaccination with purified Dr fimbriae reduces mortality associated with chronic urinary tract infection due to *Escherichia coli* bearing Dr adhesin. Infect Immun. 2005;73:627-31.

58. Buckles EL, Bahrani-Mougeot FK, Molina A, Lockatell CV, Johnson DE, Drachenberg CB, Burland V, Blattner FR, Donnenberg MS. Identification and

characterization of a novel uropathogenic *Escherichia coli*-associated fimbrial gene cluster. Infect Immun. 2004;72:3890-901.

59. Riegman N, Kusters R, Van Veggel H, Bergmans H, Van Bergen en Henegouwen P, Hacker J, Van Die I. F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the *foc* gene cluster and identification of minor subunits. J Bacteriol. 1990;172:1114–1120.

60. Emody L, Kerenyi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents. 2003;22 Suppl 2:29-33.

61. Island MD, Cui X, Foxman B, Marrs CF, Stamm WE, Stapleton AE, Warren JW. Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. Infect Immun. 1998;66:3384-9.

62. Island MD, Cui X, Warren JW. Effect of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 on repair of human bladder cell monolayers *in vitro*. Infect Immun. 1999;67:3657-61.

63. Johnson DE, Drachenberg C, Lockatell CV, Island MD, Warren JW, Donnenberg MS. The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and tissue injury in a murine model of urinary tract infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000;28:37-41.

64. Tavechio AT, Marques LR, Abe CM, Gomes TA. Detection of cytotoxic necrotizing factor types 1 and 2 among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with and without diarrhea. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:81-3.

65. Wandersman C, Delepelaire P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:4776-80.

66. Martinez-Martinez L, Fernandez F, Perea EJ. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 1999;43:277-9.

67. Cavalieri SJ, Bohach GA, Snyder IS. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. Microbiol Rev. 1984;48:326-43.

68. Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockatell CV, Jones BD, Warren JW. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. Infect Immun. 1990;58:1281-9.

69. Eberspacher B, Hugo F, Bhakdi S. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. Infect Immun. 1989;57:983-8.

70 Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. J Clin Microbiol. 2002;40:4445-9.

71. Mino K, Imamura K, Sakiyama T, Eisaki N, Matsuyama A, Nakanishi K. Increase in the stability of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* against cold inactivation and proteolysis by forming a bienzyme complex. Biosci Biotechnol Biochem. 2001;65:865-74.

72. Hindson VJ, Moody PC, Rowe AJ, Shaw WV. Serine acetyltransferase from Escherichia coli is a dimer of trimers. J Biol Chem. 2000;275:461-6.

73. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect Immun. 2001;69:1231-43. []

74. Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. Infect Immun. 2002;70:4539-46.

75. Heimer SR, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. Infect Immun. 2004;72:593-7.

76. Marrs CF, Zhang L, Tallman P, Manning SD, Somsel P, Raz P et al. Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2002;51:138-42.

77. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. J Infect Dis. 2005;191:46-50.

78. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Colodner R, Raz R. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:26-31.

79. Naveen R, Mathai E. Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups. Indian J Med Res. 2005;122:143-7.

80. Guyer DM, Gunther NW 4th, Mobley HL. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2001;183 Suppl 1:S32-5.

81. Parham NJ, Pollard SJ, Chaudhuri RR, Beatson SA, Desvaux M, Russell MA, Ruiz J, Fivian A, Vila J, Henderson IR. Prevalence of pathogenicity island IICFT073 genes among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005;43:2425-34.

82. Dobrindt U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 2005;295:357-71.

83. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:649-53.

84. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. Int J Antimicrob Agents. 2002;19:517-21.

85. Nicolle LE. Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies. Dis Mon. 2003;49:111-28.

86. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 2001;32:1608-14.

87. Hooton TM, Levy SB. Antimicrobial resistance: a plan of action for community practice. Am Fam Physician. 2001;63:1087-98.

88. Sotto A, De Boever CM, Fabbro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. J Clin Microbiol. 2001;39:438-44.

89. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1989;2:378-424.

90. Barišić Z, Borzić E, Šiško Kraljević K, Carev M, Zoranić V, Kaliterna V. Rise in ciprofloxacin resistance in *E. coli* from UTI from 1999 to 2004. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:550-551.

91. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GK, Carrie A, Mazzulli T, Low DE et al. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin.. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1089-92.

92. Ho MW, Wang FD, Fung CP, Liu CY. Comparative study of ceftibuten and cefixime in the treatment of complicated urinary tract infections. J Microbiol Immunol Infect. 2001;34:185-9.

93. Machado AR. O uso de antimicrobianos causa resistência: Hipótese ou fato? Prática Hospitalar. 2004;6:142-145.

94. Paterson DL. "Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. Clin Infect Dis. 2004;38 Suppl 4:S341-5.

95. Hummers-Pradier E, Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, Kochen MM. Management of urinary tract infections in female general practice patients. Fam Pract. 2005;22:71-7.

96. Talan DA, Stamm WE, Hooton TM, Moran GJ, Burke T, Iravani A, Reuning-Scherer J, Church DA. Comparison of ciprofloxacin (7 days) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14 days) for acute uncomplicated pyelonephritis pyelonephritis in women: a randomized trial. JAMA. 2000;283:1583-90.

97. Naber KG. Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. J Antimicrob Chemother. 2000;46 Suppl 1:23-7.

98. Warren JW, Abrutyn E, Hebel R, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Clin Infect Dis. 1999;29:745-58.

99. Le TP, Miller LG. Empirical therapy for uncomplicated urinary tract infections in an era of increasing antimicrobial resistance: a decision and cost analysis. Clin Infect Dis. 2001;33:615-21.

100. Sarkozy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. Vet Med Czech. 2001;46:257-74.

101. Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36:1-9.

102. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. Am Fam Physician. 2002;65:455-64.

103. Hooper DC. Expanding uses of fluoroquinolones: opportunities and challenges. Ann Intern Med. 1998;129:908-10.

104. Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:453-63.

105 Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. J Antimicrob Chemother. 2001;48:37-45.

106. Andriole VT. Quinolones. In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ, editors. Antibiotic and chemotherapy. Anti-ingfective agents and their use in therapy, 8th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003. p.349-73.

107. Trott DJ, Filippich LJ, Bensink JC, Downs MT, McKenzie SE, Townsend KM, Moss SM, Chin JJ. Canine model for investigating the impact of oral

enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2004;53:439-43.

108. Krueger WA, Ruckdeschel G, Unertl K. Influence of intravenously administered ciprofloxacin on aerobic intestinal microflora and fecal drug levels when administered simultaneously with sucralfate. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1725-30.

109. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 2000;31 Suppl 2:S24-8.

110. Walker RC. The fluoroquinolones. Mayo Clin Proc. 1999;74:1030-7.

111. Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:11801-5.

112. O'Donnell JA, Gelone SP. Fluoroquinolones. Infect Dis Clin North Am. 2000;14:489-513.

113. Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: structure and target sites. Curr Drug Targets. 2003;4:181-90.

114. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. J Biol Chem. 1998;273:27668-77.

115. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis. 2001;7:337-41.

116. Webber M, Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet Res. 2001;32:275-84.

117. Vila J, Ruiz J, Goni P, De Anta MT. Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1996 ;40:491-3.

118. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61:377-92.

119. Rodriguez-Martinez JM. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:25-31.

120. Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Ito H, Kojima T, Hattori H, Nakamura S. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37:839-45.

121. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. PLoS Biol. 2005;3:1024-33.

122. Gruger T, Nitiss JL, Maxwell A, Zechiedrich EL, Heisig P, Seeber S, Pommier Y, Strumberg D. A mutation in *Escherichia coli* DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4495-504.

123. Pena C, Albareda JM, Pallares R, Pujol M, Tubau F, Ariza J. Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:520-4.

124. Khachatourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. CMAJ. 1998;159:1129-36.

125. Allen UD, MacDonald N, Fuite L, Chan F, Stephens D. Risk factors for resistance to "first-line" antimicrobials among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in children. CMAJ. 1999;160:1436-40.

126. Lopes AA, Salgado K, Martinelli R, Rocha H. Aumento da freqüęncia de resistęncia a norfloxacina e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. Rev Ass Med Brasil 1998;44:196-200.

127. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:358-73.

128. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents 2001;17:431–7.

129. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol. 2006;8:1137-44.

130. Chen FJ, Lauderdale TL, McDonald LC, Chen PC, Yin HC, Ho M, Lo HJ. Molecular epidemiology of emerging reduced susceptibility to fluoroquinolones in Escherichia coli. J Med Microbiol. 2004;53:85-6.

131. McDonald LC, Chen FJ, Lo HJ, Yin HC, Lu PL, Huang CH, Chen P, Lauderdale TL, Ho M. Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:3084-91.

132. Oteo J, Lázaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J; Spanish members of EARSS. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. Emerg Infect Dis. 2005;11:546-53.

133. Kahlmeter G; ECO.SENS. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. J Antimicrob Chemother. 2003;51:69-76.

134. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gomez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremon A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2736-41.

135. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:1515-21.

136. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG, Buiting AG, Petit PL, Sabbe LJ, van Griethuysen AJ, de Neeling AJ. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. J Antimicrob Chemother. 2000;46:223-8.

137. Čižman M, Oražem A, Križan-Hergouth V, Kolman J. Correlation between increased consumption of fluoroquinolones in outpatients and resistance of *Escherichia coli* from urinary tract infections. J Antimicrob Chemother. 2001;47:502.

138. Johnson L, Sabel A, Burman WJ, Everhart RM, Rome M, MacKenzie TD, Rozwadowski J, Mehler PS, Price CS. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. Am J Med. 2008;121:876-84.

139. Kahlmeter G, Menday P, Cars O. Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired Escherichia coli urinary tract infection. J Antimicrob Chemother. 2003;52:1005-10.

140. Maslow JN, Lee B, Lautenbach E. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* carriage in long-term care facility. Emerg Infect Dis. 2005;11:889-94.

141. Killgore KM, March KL, Guglielmo BJ. Risk factors for community-acquired ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. Ann Pharmacother. 2004;38:1148-52.

142. Ena J, Amador C, Martinez C, Ortiz de la Tabla V. Risk factors for acquisition of urinary tract infections caused by ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. J Urol. 1995;153:117-20.

143. Talon D, Lallemand-De-Conto S, Thouverez M, Bertrand X. *Escherichia coli*: résistance aux quinolones et aux ß-lactamines des souches cliniques isolées en Franche-Comté. Pathol Biol (Paris). 2004 ;52:76-81.

144. Kern WV, Steib-Bauert M, de With K, Reuter S, Bertz H, Frank U, von Baum H. Fluoroquinolone consumption and resistance in haematology-oncology patients: ecological analysis in two university hospitals 1999-2002. J Antimicrob Chemother. 2005;55:57-60.

145. Kuntaman K, Lestari ES, Severin JA, Kershof IM, Mertaniasih NM, Purwanta M, Hadi U, Johnson JR, van Belkum A, Verbrugh HA; Antimicrobial Resistance in Indonesia, Prevalence and Prevention Study Group. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Indonesia. Emerg Infect Dis. 2005;11:1363-9.

146. Svetlansky I, Liskova A, Foltan V, Langsadl L, Krcmery V. Increased consumption of fluoroquinolones is not associated with resistance in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in the community. J Antimicrob Chemother. 2001;48:457-8.

147. Howard AJ, Magee JT, Fitzgerald KA, Dunstan FD; Welsh Antibiotic Study Group. Factors associated with antibiotic resistance in coliform organisms

from community urinary tract infection in Wales. J Antimicrob Chemother. 2001;47:305-13.

148. Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Dominguez MA, Gudiol F. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in fecal flora of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:503-5.

149. Kern WV, Klose K, Jellen-Ritter AS, Oethinger M, Bohnert J, Kern P, Reuter S, von Baum H, Marre R. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* at a cancer center: epidemiologic evolution and effects of discontinuing prophylactic fluoroquinolone use in neutropenic patients with leukemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:111-8.

150. Horcajada JP, Vila J, Moreno-Martinez A, Ruiz J, Martinez JA, Sanchez M, Soriano E, Mensa J. Molecular epidemiology and evolution of resistance to quinolones in *Escherichia coli* after prolonged administration of ciprofloxacin in patients with prostatitis. J Antimicrob Chemother. 2002;49:55-9.

151. Perea S, Hidalgo M, Arcediano A, Ramos MJ, Gomez C, Hornedo J, Lumbreras C, Folgueira D, Cortes-Funes H, Rodriguez-Noriega A. Incidence and clinical impact of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the faecal flora of cancer patients treated with high dose chemotherapy and ciprofloxacin prophylaxis. J Antimicrob Chemother. 1999;44:117-20.

152. Hoiby, N., Jarlov, J. O., Kemp, M. et al. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. Lancet. 1997;349:167–9.

153. Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Isolation of fluoroquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis. J Antimicrob Chemother. 2005;56:243-6.

154. Oethinger M, Conrad S, Kaifel K, Cometta A, Bille J, Klotz G, Glauser MP, Marre R, Kern WV. Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli bloodstream isolates from patients admitted to European cancer centers. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:387-92.

155. Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno-Martinez A, Vila J, Martinez JA, Ruiz J, Barranco M, Roig G, Soriano E. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. Clin Infect Dis. 2001;33:1682-6.

156. Gascón I, Pascual S, Plazas J, Sánchez J, Francés R, Más P, Zapater P, Pérez-Mateo M, Such J. Norfloxacin decreases bacterial adherence of quinolone-resistant strains of *Escherichia coli* isolated from patients with cirrhosis. Aliment Pharmacol Ther. 2005;21:701-7.

157. Barnard FM, Maxwell A. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser(83) and Asp(87). Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:1994-2000.

158. Qiang YZ, Qin T, Fu W, Cheng WP, Li YS, Yi G. Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother. 2002;49:549-52.

159. Tavio MM, Vila J, Ruiz J, Ruiz J, Martin-Sanchez AM, Jimenez de Anta MT. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. J Antimicrob Chemother. 1999;44:735-42.

160. Friedman SM, Lu T, Drlica K. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2378-80.

161. Jellen-Ritter AS, Kern WV. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:1467-72.

162. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1647-50.

163. Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother. 2003;51:1001-5.

164. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:3222-32.

165. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. Clin Microbiol Infect. 2005;11:256-80.

166. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 2003;51:9-11.

167. Oethinger M, Kern WV, Goldman JD, Levy SB. Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 1998;41:111-4.

168. Kern WV, Oethinger M, Jellen-Ritter AS, Levy SB. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:814-20.

169. Notka F, Linde HJ, Dankesreiter A, Niller HH, Lehn N. A C-terminal 18 amino acid deletion in MarR in a clinical isolate of *Escherichia coli* reduces

MarR binding properties and increases the MIC of ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother. 2002;49:41-7.

170. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2003;51:545-56.

171. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:3441-3.

172. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:118-25.

173. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother. 2005;56:1115-7.

174 Poirel L, Pitout JD, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. *In vivo* selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1525-7.

175. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:559-62.

176. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.

177. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2872-4.

178. Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2146-7.

179. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1178-82.

180. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2005;56:463-9.

181. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3523-5.

182. Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003. p.636-53.

183. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th International Supplement. CLSI document M 100-18, Wayne, Pennsylvania, 2008.

184. Darville JM, Lovering AM. Variation in the content of ciprofloxacin susceptibility testing discs: its effect on the BSAC disc method. J Antimicrob Chemother. 2003;51:465-7.

185. Baskin H, Dogan Y, Bahar IH, Yulug N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents. 2002;19:79-82.

186. Ruiz J, Marco F, Goni P, Gallardo F, Mensa J, Trilla A et al. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 1995;36:737-8.

187. Naravaneni R, Jamil K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. J Med Microbiol. 2005;54:51-4.

188. Ozeki S, Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. J Clin Microbiol. 1997;35:2315-9.

189. Oram M, Fisher LM. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:387-9.

190. Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Ezaki T, Maeda S, Saito I, Kawada Y. Rapid detection of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae gyrA* gene associated with decreased susceptibilities to quinolones. J Clin Microbiol. 1996;34:2255-8.

191. Morgan-Linnell SK, Becnel Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:235-41.

192. Hall TA. Bio Edit: A user friendly biological for sequence alignments and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symp Ser 2004;41:95-8.

193. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2242-8.

194. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:71-6.

195. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother. 2007;60:394-7.

196. Tamang MD, Seol SY, Oh JY, Kang HY, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Kim J. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:4159-62.

197. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2872-4.

198. Birošova E, Siegfried L, Kmet'ova M, Makara A, Ostro A, Grešova A et al. Detection of virulence factors in alpha-haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from various clinical materials. Clin Microbiol Infect. 2004;10:569-73.

199. Morin MD, Hopkins WJ. Identification of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction and their association with infectivity in mice. Urology. 2002;60:537-41.

200. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. PCR Methods Appl. 1993;3:S18-29.

201. Birosova E, Siegfried L, Kmet'ova M, Makara A, Ostro A, Gresova A, Urdzik P, Liptakova A, Molokacova M, Bartl R, Valansky L. Detection of virulence factors in alpha-haemolytic Escherichia coli strains isolated from various clinical materials. Clin Microbiol Infect. 2004;10:569-73.

202. Stéphane Watt, Philippe Lanotte, Laurent Mereghetti, Maryvonne Moulin-Schouleur, Bertrand Picard, and Roland Quentin. Escherichia coli Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors J Clin Microbiol. 2003;41:1929–1935.

203 Kalenić S, Plečko V, Krešić S, Presečki V, Tripković V, Žele-Starčević L et al. *Helicobacter pylori*: in vitro induction of resistance to azithromycin. Chemotherapy. 1998;44:17-20.

204. Linde HJ, Lehn N. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for Escherichia coli under different growth conditions. J Antimicrob Chemother. 2004;53:252-7.

205. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 2001;4: 9pp.

206. Shao HF, Wang WP, Zhang XW, Li ZD. Distribution and resistance trends of pathogens from urinary tract infections and impact on management. Zhonghua Nan Ke Xue. 2003;9:690-2, 696.

207. Dias Neto JA, Martins ACP, Tiraboschi RB, Domingos ALA, Cologna AJ, Paschoalin EL, Tucci Jr S. Community acquired urinary tract infection: etiology and bacterial susceptibility. Acta Cirúrgica Brasileira. 2003;18 Supl 5:33-36.

208. Andreu A, Alós JI, Gobernado M, Marco F, de la Rosa M, García-Rodríguez JA; Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:4-9.

209. Ho PL, Yip KS, Chow KH, Lo JY, Que TL, Yuen KY. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause acute uncomplicated cystitis in women in Hong Kong: a prospective multicenter study in 2006 to 2008. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;66:87-93.

210. Chaniotaki S, Giakouppi P, Tzouvelekis LS, Panagiotakos D, Kozanitou M, Petrikkos G, Avlami A, Vatopoulos AC; WHONET Study Group. Quinolone resistance among *Escherichia coli* strains from community-acquired urinary tract infections in Greece. Clin Microbiol Infect. 2004;10:75-8.

211. van Belkum A, Goessens W, van der Schee C, Lemmens-den Toom N, Vos MC, Cornelissen J, Lugtenburg E, de Marie S, Verbrugh H, Lowenberg B, Endtz H. Rapid emergence of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* containing multiple gentamicin resistance-associated integrons in a Dutch hospital. Emerg Infect Dis. 2001;7:862-71.

212. Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno-Martinez A, Vila J, Martinez JA, Ruiz J, Barranco M, Roig G, Soriano E. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. Clin Infect Dis. 2001;33:1682-6.

213. Vila J, Simon K, Ruiz J, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Moreno A, Mensa J. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? J Infect Dis. 2002;186:1039-42.

214. Johnson JR, Scheutz F, Ulleryd P, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Sandberg T. Host-pathogen relationships among Escherichia coli isolates recovered from men with febrile urinary tract infection. Clin Infect Dis. 2005;40:813-22.

215. Wang MC, Tseng CC, Chen CY, Wu JJ, Huang JJ. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. Clin Infect Dis. 2002;35:1161-6.

216. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, Nica M, Le Bouguenec C. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. J Cell Mol Med. 2001;5:303-10.

217. Hull RA, Rudy DC, Wieser IE, Donovan WH. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries. J Clin Microbiol. 1998;36:115-7.

218. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology. 2001;147:1671-6.

219. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, Vila J. Extended virulence genotypes and phylogenetic

background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. J Infect Dis. 2005;191:46-50.

220. Tiba MR, Yano T, Leite Deda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008;50:255-60.

221. Drews SJ, Poutanen SM, Mazzulli T, McGeer AJ, Sarabia A, Pong-Porter S, Rzayev Y, Willey B, Green K, Low DE. Decreased prevalence of virulence factors among ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol. 2005;43:4218-20.

222. Houdouin V, Bonacorsi S, Bidet P, Bingen-Bidois M, Barraud D, Bingen E. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. J Antimicrob Chemother. 2006;58:748-51.

223. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital.Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:3992-7.

224. Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. J Antimicrob Chemother. 2008;62:474-8.

225. Vasilaki O, Ntokou E, Ikonomidis A, Sofianou D, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S, Maniatis AN, Pournaras S. Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in *Escherichia coli* isolates in Greece. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2996-7.

226. Jeong JY, Yoon HJ, Kim ES, Lee Y, Choi SH, Kim NJ, Woo JH, Kim YS. Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2522-4.

227. Hallett P, Maxwell A. Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:335-40.

228. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003;51:1109-17.

229. Dimitrov T, Dashti AA, Albaksami O, Udo EE, Jadaon MM, Albert MJ. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Kuwait with novel mutations in *gyrA* and *parC* genes. J Clin Microbiol. 2009;47:208-11.

230. Chen FJ, McDonald LC, Ho M, Lo HJ. Identification of reduced fluoroquinolone susceptibility in *Escherichia coli*: a herald for emerging resistance. J Antimicrob Chemother. 2001;48:936-8.

231. Yu X, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. J Clin Microbiol. 2004;42:4083-91.

232. Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:2380-6.

233. Jimenez Gomez PA, Garcia de los Rios JE, Rojas Mendoza A, de Pedro Ramonet P, Garcia Albiach R, Reche Sainz MP. Molecular basis of quinolone resistance in *Escherichia coli* from wild birds. Can J Vet Res. 2004;68:229-31.

234. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goni P, Giralt E, Jimenez de Anta T. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:2477-9.

235. Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L, White DG. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol. 2005;107:215-24.

236. Lee YJ, Cho JK, Kim KS, Tak RB, Kim AR, Kim JW, Im SK, Kim BH. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. J Microbiol. 2005;43:391-7.

237. Hooper DC, Wolfson JS, Souza KS, Tung C, McHugh GL, Swartz MN. Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1986 ;29:639-44.

238. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Colodner R, Raz R. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4739-44.

10. Životopis

ADRESA STANOVANJA Karamanova 3, 21000 Split

DATUM I MJESTO ROĐENJA 23. svibnja 1963. g., Zagreb

ŠKOLOVANJE

1981. završio Zdravstvenu školu u Splitu

1988. diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1994. položio specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije s parasitologijom

1999. stekao zvanje magistra medicinskih znanosti obranom rada "Vrste i osjetljivost na antibiotike enterokoka izoliranih iz bolničkih i izvanbolničkih uzoraka na području Splitsko-dalmatinske županije"

STRUČNA USAVRŠAVANJA

1991.-1994. specijalizacija iz medicinske mikrobiologije s parasitologijom

1992.-1993. poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije s parasitologijom

1997 poslijediplomski edukacijski tečaj Évolution des relation hôtes-parasites, Pariz

1999 poslijediplomski edukacijski tečaj Laboratory diagnosis of infections during pregnancy, Berlin

RADNO ISKUSTVO

1988. do 1989. liječnik u Domu zdravlja Split

1989. do 1990. liječnik u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć Split

1990. do 1991. liječnik u Hrvatskom zavodu za zdravstveno osiguranje, Područni ured Split

1991. – danas specijalist mikrobiolog u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije u Splitu

Prvi sam autor ili koautor u 4 znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom koji se citiraju u bazi Current Contents, u dva znanstvena rada objavljena u časopisu s međunarodnom recenzijom koji se citira u bazi Indeks Medicus/MEDLINE, te u više radova objavljenima u domaćim stručnim časopisima.

Prvi sam autor ili koautor u 34 kongresna rada koji su predstavljeni na međunarodnim i domaćim kongresima i stručnim skupovima.

Sudjelovao sam na preko 20 europskih i domaćih kongresa i stručnih skupova.

Moja biografija je objavljena u knjigama Vodeći hrvatski liječnici u izdanju Instituta za vrednovanje i promicanje znanstvenih i stručnih postignuća 2004.g., te u Marquis Who's Who in Medicine and Healthcare, 6th ed. 2006-2007 u izdanju Marquis Who's Who, New Providence NJ, USA 2006.g.

Koristim se engleskim, njemačkim, francuskim jezikom.

Istraživački su mi interesi dijagnostika infekcija mokraćnog sustava, dijagnostika tuberkuloze, te otpornost bakterija na antibiotike

Član sam Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, te International Society of Chemotherapy