

Molekularna analiza gena nim i inducibilne rezistencije na metronidazol u kliničkih izolata grupe *Bacteroides fragilis*

Presečki Stanko, Aleksandra

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:672071>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra Presečki Stanko

**Molekularna analiza gena *nim* i
inducibilne rezistencije na
metronidazol u kliničkih izolata grupe
*Bacteroides fragilis***

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra Presečki Stanko

**Molekularna analiza gena *nim* i
inducibilne rezistencije na
metronidazol u kliničkih izolata grupe
*Bacteroides fragilis***

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju
Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Vanda Plečko

Zahvala

Zahvaljujem prof. dr. sc. Smilji Kalenić i svome mentoru, prof. dr. sc. Vandi Plečko, na poticaju mojem znanstvenom radu.

Zahvaljujem dr. Józsefu Sókiju u Institutu za kliničku mikrobiologiju Sveučilišta u Segedinu, Mađarska, na susretljivosti, pomoći i savjetima tijekom istraživačkog dijela rada.

Zahvaljujem i svim suradnicima u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju na razumijevanju i pruženoj potpori.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj dragoj obitelji i roditeljima, na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i vjeri u moj uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ROD BACTEROIDES	4
1.1.1. Fiziologija i epidemiologija	4
1.1.2. Patogeneza i imunost.....	4
1.1.3. Klinička slika.....	5
1.1.4. Identifikacija	6
1.1.4.1. Preliminarna identifikacija.....	6
1.1.4.2. Definitivna identifikacija	6
1.2. METRONIDAZOL	7
1.2.1. Mehanizam djelovanja	8
1.2.2. Mehanizam rezistencije.....	10
1.2.2.1. 5-nitroimidazol reduktaza	11
1.3. REZISTENCIJA NA ANTIMIKROBNA SREDSTVA.....	13
1.3.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike	14
1.3.2. Rezistencija na tetracikline.....	16
1.3.3. Rezistencija na eritromicin	17
1.3.4. Rezistencija na klindamicin	17
1.3.5. Rezistencija na moksifloksacin.....	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
2.1. Opći ciljevi.....	18
2.2. Specifični ciljevi.....	18
3. HIPOTEZA	19
4. MATERIJAL I METODE	20
4.1. MATERIJAL	20
4.1.1. Mikroorganizmi.....	20
4.1.1.1. Klinički izolati	20
4.1.1.2. Standardni sojevi.....	20
4.1.2. Hranjive podloge	20
4.1.3. Kemikalije i reagensije	21
4.1.4. Antimikrobna sredstva.....	21
4.1.5. Aparatura i pribor	23

4.2. METODE	24
4.2.1. Izolacija bakterijskih sojeva	24
4.2.2. Pohrana sojeva u čistoj kulturi.....	24
4.2.3. Identifikacija bakterijskih vrsta.....	25
4.2.3.1. Test aerotolerancije	25
4.2.3.2. Bojenje po Gramu	26
4.2.3.3. Test katalaze	26
4.2.3.4. API 20A	27
4.2.3.5. MALDI-TOF masena spektrometrija	28
4.2.4. Testiranje osjetljivosti na antimikrobna sredstva	29
4.2.4.1. Metoda dilucije u agaru	29
4.2.4.2. Metoda disk-difuzije.....	32
4.2.5. Indukcija rezistencije na metronidazol.....	33
4.2.6. Mjerenje aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH).....	35
4.2.7. Probir na gene rezistencije.....	36
4.2.7.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK)	36
4.2.7.2. Umnožavanje regije DNK od interesa	36
4.2.7.2.1. <i>nim</i> geni rezistencije	36
4.2.7.2.2. <i>cepA</i> , <i>cfiA</i> , <i>ermF</i> i <i>tetQ</i> geni rezistencije	37
4.2.7.3. Detekcija produkta umnoženog PCR-om	39
5. REZULTATI	40
5.1. Osjetljivost na ostala antimikrobna sredstva	44
5.2. Ostali geni rezistencije	47
5.3. Indukcija rezistencije	52
5.4. Laktat dehidrogenaza	54
5.5. Gel elektroforeza produkta umnožavanja	56
6. RASPRAVA	60
7. ZAKLJUČCI.....	68
8. SAŽETAK	70
8.1. Sažetak na hrvatskom jeziku	70
8.2. Sažetak na engleskom jeziku (<i>Summary</i>).....	71
9. LITERATURA	72

10. PRILOZI	82
10.1. Popis slika.....	82
10.2. Popis tablica	83
10.3. Popis dijagrama.....	84
11. ŽIVOTOPIS	85

POPIS OZNAKA I KRATICA

AMC	amoksicilin s klavulanskom kiselinom engl. <i>Amoxicillin Clavulanate</i>
ATCC	američka zbirka standardnih bakterijskih sojeva engl. <i>American Type Culture Collection</i>
BBE	podloga sa žuči i eskulinom za izolaciju bakteroidesa engl. <i>Bacteroides Bile Esculin Agar</i>
BCP	ljubičasti bromkrezol engl. <i>Bromocresol Purple</i>
BD BBL	Becton Dickinson BBL
BHIS	obogaćeni moždano-srčani (bujon) engl. <i>Brain-Heart Infusion Supplemented (Broth)</i>
°C	stupnjeva Celzijevih
CLI	klindamicin engl. <i>Clindamycin</i>
CLSI	američki standard testiranja osjetljivosti bakterija na antibiotike engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilen diamin tetra-acetat
EHR	Ehrlichov reagens
ESCMID	Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti engl. <i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ESGAI	radna skupina za anaerobne infekcije pri Europskom društvu za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti engl. <i>ESCMID Study Group for Anaerobic Infections</i>
EUCAST	europski standard testiranja osjetljivosti bakterija na antibiotike engl. <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAD	flavin adenin dinukleotid
IS	insercijska sekvenca
g	gram
GEL	želatina engl. <i>Gelatine</i>
GLY	glicerol

	engl. <i>Glycerol</i>
h	sat
L	litra
IMI	imipenem s cilastatinom
IND	indol
KDO	2-keto-3-deoksioktonat
KVLB	krvna podloga s kanamicinom i vankomicinom za izolaciju bakteroidesa i prevotella
	engl. <i>Kanamycin Vancomycin Laked Blood Agar</i>
LDH	laktat dehidrogenaza
MALDI	matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
	engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MET	metronidazol
mg	miligram
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
mL	mililitar
MLS _B	makrolidi-linkozamidi-streptogramini B
mm	milimetar
mM	milimol
MOX	moksifloksacin
	engl. <i>Moxifloxacin</i>
MS	masena spektrometrija
NCTC	britanska zbirka standardnih bakterijskih sojeva
	engl. <i>National Collection of Type Culture</i>
PBP	protein koji veže penicilin
	engl. <i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze
	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFOR	piruvat:feredoksin oksidoreduktaza
RE	restrikcijske endonukleaze
	engl. <i>Restriction Endonucleases</i>
RFLP	polimorfizam dužine restrikcijских fragmenata
	engl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

spp.	vrsta lat. <i>species</i>
TAE	tris-acetat + EDTA
TOF	vrijeme leta engl. <i>Time of Flight</i>
TGC	tigeciklin
TRE	trehaloza
tRNA	transportna ribonukleinska kiselina engl. <i>transport RiboNucleic Acid</i>
TZP	piperacilin s tazobaktamom
V	volt
XYL	ksiloza engl. <i>Xylose</i>
µg	mikrogram
µL	mikrolitar

1. UVOD

Rod *Bacteroides* obuhvaća gram-negativne, anaerobne bakterije, štapićastog oblika bez spora. Vrste *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. merde*, *B. stercoris* i *B. uniformis* čine *B. fragilis* grupu (1). Bakterije ovog roda su najbrojnije bakterije fekalne mikrobiote, koje ponekad izoliramo i iz gornjeg dijela gastrointestinalnog, respiratornog te donjeg dijela genitalnog sustava u žena (2-4).

Unutar svog prirodnog staništa *Bacteroides* spp. ima važnu ulogu u održavanju lokalne i sistemne imunosti; sprječava kolonizaciju sluznice patogenim bakterijama, npr. bakterijom *Clostridium difficile*, te sudjeluje u procesu probave hrane. Međutim, izvan svog prirodnog staništa može uzrokovati endogene infekcije u fiziološki sterilnim tkivima i tjelesnim tekućinama (3, 5-6).

To su najčešće polimikrobne intraabdominalne infekcije, zatim upalna bolest male zdjelice, ovarijalni, te apscesi pluća i mozga i bakterijemija. Najčešće izolirane vrste u ovim infekcijama su *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*.

Toksigeni sojevi *B. fragilis*, koji luče enterotoksin, uzročnici su proljeva (7-8).

Bacteroides spp. ima najveći postotak rezistentnih sojeva među svim patogenim anaerobnim bakterijama, a posjeduje i različite mehanizme rezistencije na antimikrobna sredstva (9-10). Najrezistentnija vrsta je *B. distasonis*, a potom *B. thetaiotaomicron*.

U Engleskoj je 1978. izoliran prvi puta soj *B. fragilis* visoko rezistentan na metronidazol (MIK 64 mg/L), a od ranih 80-tih godina prošlog stoljeća bilježi se porast rezistencije unutar skupine anaerobnih bakterija i na ostala antimikrobna sredstva koja se koriste u liječenju anaerobnih infekcija (11).

Širom svijeta pojavljuju se sojevi *Bacteroides* spp. sa smanjenom osjetljivošću na najučinkovitija antimikrobna sredstva u liječenju anaerobnih infekcija, kao što su određene kombinacije beta-laktamskih antibiotika s inhibitorom beta-laktamaze, karbapenemi, fluorokinoloni IV generacije i antibiotici iz skupine 5-nitroimidazola (8, 12).

Spomenuti soj *B. fragilis* visoko rezistentan na metronidazol, izoliran je u bolesnika s Crohn-ovom bolesti, koji je dugotrajno liječen metronidazolom (11).

Metronidazol je lijek koji se koristi već više desetljeća u profilaksi i liječenju infekcija uzrokovanim anaerobnim bakterijama. Primjenjuje se u inaktivnom obliku kao takozvani

pro-lijek, a aktivira se u bakterijskoj stanici redukcijom svoje nitroskupine (13). Po svojoj kemijskoj strukturi pripada već spomenutoj skupini 5-nitroimidazola (14).

Mogući mehanizmi rezistencije na metronidazol uključuju otežan ulaz lijeka u bakterijsku stanicu; smanjenu aktivaciju lijeka; alternativnu redukciju produktom *nim* gena; izbacivanje (takozvani efluks) lijeka iz bakterijske stanice i popravak oštećenja na molekuli deoksiribonukleinske kiseline bakterije (10, 14-17).

Najviše istraživani mehanizam rezistencije unutar *B. fragilis* grupe je alternativna 5-nitroimidazol reduktaza, koja je produkt *nim* gena rezistencije. Do danas je otkriveno deset tipova *nim* gena (*nimA-J*), od kojih su neki smješteni na kromosomu (npr. *nimB*), a drugi na plazmidu (npr. *nimA*, *nimC*, *nimD*) (18-23). Procesom konjugacije moguć je prijenos *nim* gena rezistencije ne samo unutar roda *Bacteroides*, nego i između roda *Bacteroides* i drugih gram-negativnih i gram-pozitivnih anaerobnih bakterija (24-25).

Postojanje *nim* gena rezistencije *per se* ne podrazumijeva nužno terapijsku rezistenciju na metronidazol (1). Proces transkripcije *nim* gena naime pospješuju promotori, koji su smješteni unutar odgovarajućih insercijskih sekvencija (IS) (14).

Postupnim izlaganjem sojeva *Bacteroides* spp. koji su fenotipski osjetljivi na metronidazol sve većim koncentracijama metronidazola, počevši s onim subinhibitornima, može se inducirati rezistencija na metronidazol s vrijednošću MK-a čak i iznad 256 mg/L. (14, 26-27). Nastala rezistencija može biti reverzibilna ili ireverzibilna.

Postojanje sojeva koji su nosioci *nim* i ostalih gena rezistencije, kao i pojava multirezistentnih sojeva, zahtijevaju sve više rutinsko testiranje klinički značajnih izolata *B. fragilis* grupe na antimikrobna sredstva, a po mogućnosti i probir izoliranih sojeva na gene rezistencije (18, 28) ili njihove produkte (29).

Podaci o osjetljivosti značajnih izolata *B. fragilis* grupe na antimikrobna sredstva dobiveni tek periodičkim testiranjem izoliranih sojeva na lokalnoj ili nacionalnoj razini često nisu dovoljni za odabir odgovarajuće empirijske terapije (30).

Moguća primjena neodgovarajuće terapije ima za posljedicu dulju hospitalizaciju i veću smrtnost bolesnika (8, 24, 31-32).

Svrha ovog rada je utvrditi učestalosti *nim* gena rezistencije u sojevima *B. fragilis* grupe; otkrivanje novih spoznaja u procesu indukcije rezistencije na metronidazol, ovisno o vrsti mehanizma rezistencije, te moguća primjena ovih spoznaja na druge klinički značajne anaerobne bakterije, kao i na druga antimikrobna sredstva, koja se koriste u prevenciji i liječenju anaerobnih infekcija.

1.1. ROD BACTEROIDES

1.1.1. Fiziologija i epidemiologija

Pripadnici ove skupine su gram-negativni štapići zaobljenih krajeva, bez spora koji su obligatni anaerobi. Lipopolisaharid stanične stijenke ne sadrži 2-keto-3-deoksioktonat (KDO) ni heptozu, tako da za razliku od aerobnih i fakultativno anaerobnih gram-negativnih bakterija, ima slabo endotoksično djelovanje (33).

Na krvnom anaerobnom agaru nakon 24-48 h inkubacije stvaraju okrugle, konveksne kolonije, pravilnog ruba, veličine 1-3 mm, koje su ili prozirne ili sivo-bijele boje. Manje od 1% sojeva pokazuje hemolizu.

Na selektivnoj podlozi sa žuči i eskulinom (BBE agar) rastu kolonije crne boje, osim u slučaju *B. vulgatus*, koji nema sposobnost hidrolize eskulina, te nekih sojeva *B. uniformis*, koji vrlo slabo rastu u prisutnosti žuči.

Kolonije rastu i na selektivnoj podlozi s dodatkom antibiotika kanamicina i vankomicina (KVLB agar) (34).

Bacteroides spp. kolonizira sluznice usne šupljine, probavnog trakta i rodnice. U stolici zdrave osobe može se naći 10^{11} *B. fragilis*/g stolice.

1.1.2. Patogeneza i imunost

Bacteroides spp. sadrži nekoliko čimbenika virulencije (3, 33, 35).

Kapsularni polisaharid inhibira opsonizaciju i fagocitozu i potiče stvaranje apscesa.

Pili potiču adherenciju za stanice epitela i izvanstanične molekule, npr. fibronektin, fibrinogen.

Sukcinila kiselina inhibira fagocitozu i intracelularno ubijanje bakterije.

Enzimi, npr. IgA proteaza, heparinaza, neuraminidaza, hijaluronidaza i fibrinolizin pridonose razaranju tkiva i širenju bakterija, a konvertaze žučnih soli oslobađaju žučne kiseline i sudjeluju u patogenezi steatoreje.

Enterotoksin fragilizin, koji je termolabilna cink-metaloproteinaza, uzrokuje morfološke promjene na crijevnom epitelu s pojačanim izlučivanjem klorida i gubitkom tekućine, a potiče i izlučivanje interleukina 8 (IL-8) i posljedično upalno oštećenje epitela.

1.1.3. Klinička slika

B. fragilis uzrokuje gotovo 2/3 intraabdominalnih apscesa, koji nastaju kao komplikacija bilo kirurškog zahvata, perforacije šupljeg organa ili maligne bolesti (33, 36).

U maloj zdjelici uzrokuje tuboovarijski i apsces u Douglasovu prostoru, salpingitis, endometritis, infekciju rane nakon carskog reza i histerektomije.

Uzročnik je također infekcija kože i mekih tkiva u dijabetičara i nosilaca dekubitalnih ulkusa, te Fournierove gangrene.

Najčešći je uzročnik bakterijemije među svim anaerobnim bakterijama.

Rjeđe uzrokuje infekcije respiratornog i središnjeg živčanog sustava, te kostiju.

Toksigeni sojevi *B. fragilis* koji luče enterotoksin uzročnici su proljeva, poglavito u djece (7-8, 37).

1.1.4. Identifikacija

Identifikacija *Bacteroides spp.* temelji se na preliminarnoj i definitivnoj identifikaciji.

1.1.4.1. Preliminarna identifikacija

Preliminarna identifikacija obuhvaća izgled poraslih kolonija na krutoj podlozi, opis mikroskopskog preparata po Gramu, brze testove poput katalaze i *spot* indola, ispitivanje osjetljivosti na kanamicin, vankomicin i kolistin, rast u podlozi s dodatkom žuči, te hidrolizu eskulina.

B. fragilis grupa je rezistentna na sva tri navedena antimikrobna sredstva, pa u testu koji koristi kombinaciju diskova kanamicina (1000 µg), vankomicina (5 µg) i kolistina (10 µg) ispitivani soj raste sve do ruba diskova.

B. fragilis grupa je također rezistentna na žuč, pa ispitivani soj raste na podlogama s dodatkom žuči (npr. BBE agar; tekuća podloga s 20% žuči). Izuzetak je vrsta *B. uniformis*, koji vrlo slabo raste u prisutnosti žuči.

B. fragilis grupa hidrolizira eskulin, osim vrste *B. vulgatus*, koji stoga na selektivnoj podlozi sa žuči i eskulinom (BBE agar) neće stvoriti kolonije crne boje (34).

1.1.4.2. Definitivna identifikacija

Za definitivnu identifikaciju pojedine vrste koriste se:

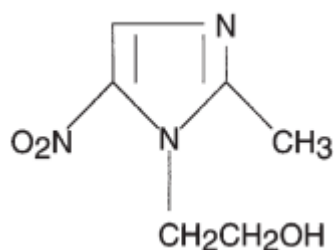
- testovi za ispitivanje saharolitične sposobnosti soja, npr. komercijalni sistem API 20A, bioMérieux;
- brzi testovi za detekciju preformiranih, konstitutivnih enzima, npr. komercijalni sistem Rapid ID 32A, bioMérieux;
- plinsko-tekućinska kromatografija za određivanje profila masnih kiselina, te
- masena spektrometrija, kojom se određuje prostorna raspodjela makromolekula, prvenstveno proteina (34, 38).

1.2. METRONIDAZOL

Metronidazol je već više desetljeća lijek prvog izbora protiv mnogih anaerobnih bakterija (npr. *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Clostridium*), protozoa (npr. *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*) i mikroaerofilne bakterije *H. pylori* (16).

Koristi se u liječenju intraabdominalnih i infekcija u maloj zdjelici, proljeva koji su povezani s uporabom antibiotika, bakterijske vaginoze, te u perioperativnoj profilaksi u abdominalnoj kirurgiji (39).

Po kemijskoj strukturi je 5-nitroimidazol, tj. imidazolni derivat koji sadrži nitro-skupinu ($-\text{NO}_2$) vezanu za ugljikov atom na položaju 5 imidazolnog prstena (13) (Slika 1.).



Slika 1. Kemijska struktura metronidazola (1-(β-hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol)
(Land KM, ref.13)

Metronidazol se primjenjuje u inaktivnom obliku kao takozvani pro-lijek, koji se tek unutar bakterijske stanice pretvara u aktivni oblik, procesima kemijske redukcije putem mehanizama koji su svojstveni anaerobnom metabolizmu.

Reducirani oblik metronidazola je toksičan za stanične makromolekule, a stupajući u interakciju s deoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) uzrokuje smrt bakterijske stanice.

1.2.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja metronidazola odvija se u četiri koraka, koji uključuju:

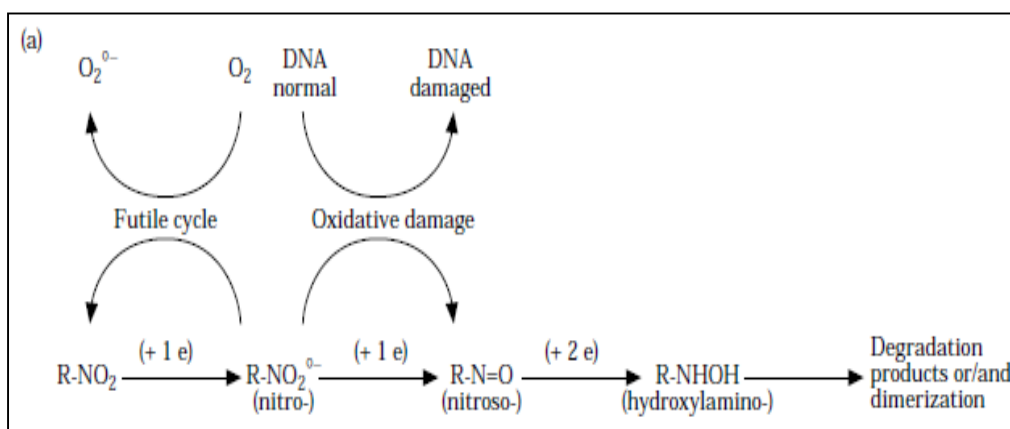
- ulaz lijeka u bakterijsku stanicu,
- aktivaciju lijeka procesom redukcije uz intracelularne transportne proteine,
- interakciju sa staničnim makromolekulama i
- razgradnju citotoksičnih intermedijarnih produkata.

Metronidazol je male molekularne težine, pa ulazi u bakterijsku stanicu procesom pasivne difuzije (40).

Unutar anaerobne bakterijske stanice, u odsutnosti kisika aktivira se redukcijom svoje nitro-skupine ($-\text{NO}_2$), pri čemu nastaju sljedeći intermedijarni produkti:

slobodni nitro radikal ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$); nitrozo- (RNO) i hidroksilamino- (RNHOH) derivati.

Osobitu citotoksičnost pokazuje slobodni nitro radikal ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) (41) (Slika 2.).

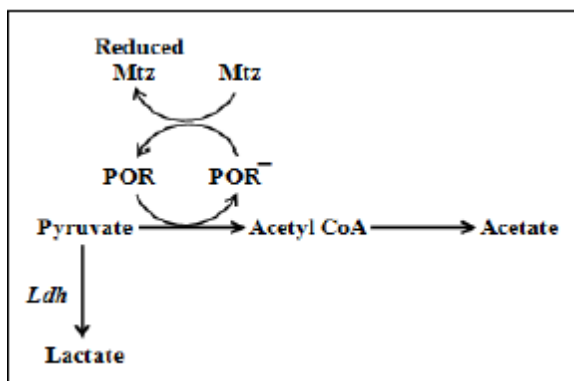


Slika 2. Put aktivacije metronidazola procesom redukcije (Reysset G, ref. 41)

R-NO_2 – metronidazol; $\text{RNO}_2^{\cdot-}$, RNO , RNHOH – nastali međuprodukti u anaerobnim uvjetima.

U slučaju nastupa aerobnih uvjeta, redukcija metronidazola je bezuspješna (engl. *Futile cycle*).

U mikroorganizmima s fermentativnim metabolizmom kao izvor elektrona u procesu redukcije služe feredoksin i flavodoksin. Ti proteini djeluju kao biološki akceptori elektrona s hidrogenaza i unutar piruvat:feredoksin oksidoredukcijskog (PFOR) kompleksa. PFOR kompleks nastaje u procesu oksidacijske dekarboksilacije piruvata u acetil Co-A (Slika 3.) i smatra se da ima glavnu ulogu u aktivaciji metronidazola i osjetljivosti bakterijske stanice na metronidazol (42-44).



Slika 3. Mjesto djelovanja piruvat:feredoksin oksidoredukcijskog kompleksa u nastanku reduciranog oblika metronidazola (Diniz CG, ref. 48)

POR - piruvat:feredoksin oksidoredukcijski kompleks, Ldh – laktat dehidrogenaza.

Prikazan je i mogući put pretvorbe piruvata u laktat.

Kako je reduksijski potencijal ovih proteina više negativan u odnosu na reduksijski potencijal molekule 5-nitroimidazola, oni doniraju elektrone metronidazolu (41, 45). Redukcijom metronidazola nastaje koncentracijski gradijent, što pospješuje ulazak inaktivnog metronidazola u bakterijsku stanicu (16, 46).

U slučaju prisutnosti kisika, slobodni nitro radikal (RNO_2) se reoksidira i ponovno pretvara u inaktivni oblik, pa govorimo o tzv. bezuspješnom ciklusu (engl. *futile cycle*) u kojem nastaje i superoksidni anion (O_2^-) (41, 47-48).

Ovime se objašnjava djelotvornost metronidazola u striktno anaerobnim uvjetima (41).

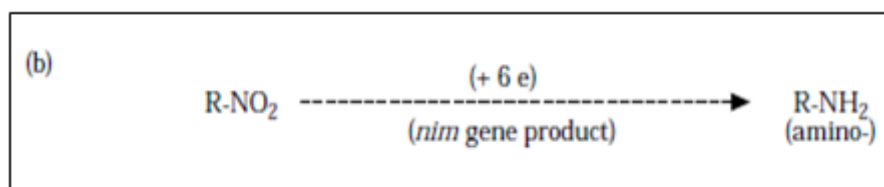
Nastali produkti s citotoksičnom aktivnosti dovode do pucanja jednog ili oba lanca DNK, nestanka strukture *helix*-a i inhibicije sinteze DNK, što sve dovodi konačno do smrti bakterijske stanice (41). Raspadom ovih produkata nastaju krajnji inaktivni produkti (Slika 2.).

1.2.2. Mehanizam rezistencije

Iako se metronidazol koristi već više desetljeća u liječenju anaerobnih infekcija, rezistencija *B. fragilis* na metronidazol je niska (16), no postoji trend porasta rezistencije (49).

Mehanizmi rezistencije obuhvaćaju otežan ulaz lijeka u bakterijsku stanicu; smanjenu aktivaciju lijeka; inaktivaciju lijeka alternativnom 5-nitroimidazol reduktazom; izbacivanje (takozvani efluks) lijeka iz bakterijske stanice i popravak oštećenja na molekuli DNK bakterijske stanice (15-16).

Najviše istraživani mehanizam rezistencije unutar *B. fragilis* grupe je 5-nitroimidazol reduktaza, enzim koji je produkt *nim* gena, a dovodi do pretvorbe metronidazola u aminoderivat, koji međutim nije toksičan za molekulu DNK bakterijske stanice (41) (Slika 4.).



Slika 4. Redukcija metronidazola u aminoderivat, djelovanjem produkta *nim* gena (Reysset G, ref. 41)

R-NO₂ – metronidazol, R-NH₂ – aminoderivat.

1.2.2.1. 5-nitroimidazol reduktaza

Enzim 5-nitroimidazol reduktaza je alternativna reduktaza, koja pretvara metronidazol u inaktivni 5-aminoimidazolni oblik, bez citotoksičnog potencijala za makromolekule bakterijske stanice (16).

Produkcija 5-nitroimidazol reduktaze se povezuje s *nim* genima rezistencije. Do danas je otkriveno 10 tipova *nim* gena (*nimA-J*) (18-22).

Geni *nimA-H* su detektirani u *B. fragilis* grupi, a *nimI* u anaerobnoj bakteriji *Prevotella* spp. (21). Gen *nimJ*, koji se nalazi u određenim sojevima *B. fragilis*, je novi *nim* gen, kojeg nije moguće detektirati uporabom univerzalnih početnica za *nim* gene (19).

Nim geni su veličine oko 500 bp (npr. *nimA* 531 bp; *nimB* kao i *nimC* 495 bp; *nimD* 492 bp). Neki *nim* geni su smješteni na kromosomu (npr. *nimB* i vjerojatno *nimF*), a drugi na plazmidu (npr. *nimA*, *nimC*, *nimD*, *nimE*) (23, 41, 50-51).

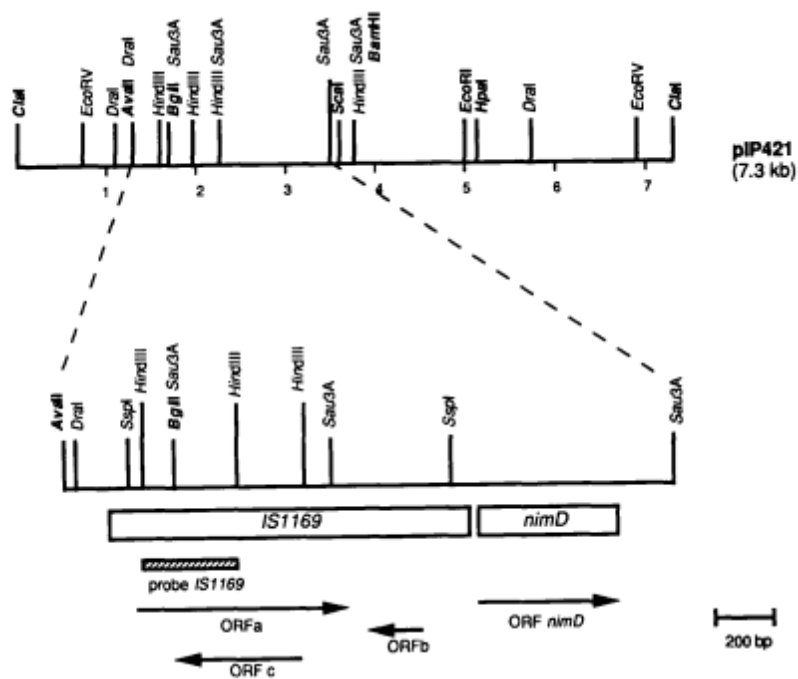
Tako plazmid pIP417 koji je veličine 7,7 kb nosi *nimA*; plazmid pIP419 (10 kb) nosi *nimC*, a plazmid pIP421 (7,3 kb) nosi *nimD* (52) (Slika 5.).

Geni *nimA-F* dijele međusobno oko 70% slijeda nukleotida DNK, dok geni *nimG* i *nimB* pokazuju čak 88% homolognosti.

Procesom konjugacije moguć je prijenos *nim* gena rezistencije ne samo unutar *B. fragilis* grupe, nego i između te grupe i drugih gram-negativnih, te gram-pozitivnih anaerobnih bakterija (17, 24-25, 53).

Postojanje *nim* gena rezistencije samo po sebi ne podrazumijeva nužno terapijsku rezistenciju na metronidazol. Proces transkripcije *nim* gena reguliraju i pospješuju promotori, koji su smješteni unutar odgovarajućih insercijskih sekvencija (IS) (14, 54). IS se nalazi unutar tzv. *upstream* regije *nim* gena, a nosi oznaku IS1168 za gene *nimA-B*; IS1169 za gen *nimD*, te IS1170 za gen *nimC*. Postojanje sojeva koji imaju *nim* gen, a fenotipski su osjetljivi na metronidazol može se objasniti upravo nedostatkom IS, pa takav gen nazivamo tzv. tihim genom (engl. *silent gene*) (8).

I dok posljednjih godina u Europi bilježimo smanjenje prevalencije *nim* gena (55), pa i rezistencije na metronidazol (56), u nekim drugim dijelovima svijeta, npr. Južnoj Africi postoji značajna rezistencija na metronidazol (57).



Slika 5. Mapa plazmida pIP421 i regije *nimD* gena (Trinh S, ref. 52)

Označene su pozicije insercijske sekvencije (IS) 1169 i *nimD* gena.

Također su označena mjesta djelovanja restrikcijskih enzima (npr. HindIII, EcoRI...), pozicija i smjer transkripcije pojedinih ORF (engl. *open reading frame*) segmenata, te mjesto vezanja probe za IS1169.

1.3. REZISTENCIJA NA ANTIMIKROBNA SREDSTVA

Bacteroides spp. ima različite mehanizme rezistencije na antimikrobna sredstva i bilježi najveći postotak rezistentnih sojeva među svim patogenim anaerobnim bakterijama (3, 9-10).

Stečena rezistencija može biti posljedica djelovanja enzima koji inaktivira antimikrobno sredstvo, smanjene propusnosti vanjske membrane bakterijske stanice, promjene ciljnog mjesta vezanja antimikrobnog sredstva i aktivnog izbacivanja (takozvani efluks) antimikrobnog sredstva iz bakterijske stanice (3).

Bacteroides spp. danas ima izraženu visoku rezistenciju na peniciline, cefalosporine i tetraciklin, a umjerenu rezistenciju na cefoksitin, klindamicin i većinu kinolona. Osjetljivost na karbapeneme, određene kombinacije beta-laktamskih antibiotika s inhibitorom betalaktamaze, tigeciklin i metronidazol još uvijek je visoka, iako se širom svijeta opisuju izolati sa smanjenom osjetljivošću i na ta antimikrobna sredstva (9, 56).

1.3.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike

Beta-laktamski antibiotici imaju u svojoj strukturi beta-laktamski prsten, na kojem se temelji njihovo djelovanje, ali i nastanak nekih mehanizama rezistencije bakterija (39).

Rezistencija *B. fragilis* na beta-laktamske antibiotike je posljedica produkcije enzima beta-laktamaze, promjene u porinima i propusnosti vanjske membrane ili mutacije ciljnih PBP (engl. *Penicillin Binding Protein*) molekula (10).

Postoje dvije vrste beta-laktamaza. Serinske beta-laktamaze, koje u aktivnom mjestu enzima sadrže serin i metalo beta-laktamaze, koje u aktivnom mjestu enzima sadrže ione cinka (Zn^{2+}).

Primjeri serinskih beta-laktamaza su beta-laktamaze kodirane genima *cepA* i *cfxA*, koje nazivamo cefalosporinaza, odnosno cefoksitinaza. Serinske beta-laktamaze moguće je inhibirati sulbaktamom, klavulanskom kiselinom i tazobaktamom.

Kromosomska cefalosporinaza *cepA* u divljem tipu *B. fragilis* odgovorna je za rezistenciju na aminopeniciline i cefalosporine, uz očuvanu osjetljivost na tikarcilin, piperacilin i kombinacije beta-laktamskog antibiotika s inhibitorom beta-laktamaze, npr. amoksicilina s klavulanskom kiselinom, tikarcilina s klavulanskom kiselinom i piperacilina s tazobaktamom (24).

Hiperprodukcija istoimene beta-laktamaze zbog djelovanja insercijske sekvencije IS1124, integrirane u tzv. *upstream* regiju gena *cepA*, ima za posljedicu rezistenciju i na tikarcilin i piperacilin, te povišenu vrijednost MIK-a kombinacije beta-laktamskog antibiotika s inhibitorom beta-laktamaze, ali uz još uvijek očuvanu djelotvornost lijeka (24).

Ako se ovoj hiperprodukciji kromosomske beta-laktamaze pridruži i gubitak porina, MIK kombinacije beta-laktamskog antibiotika s inhibitorom beta-laktamaze nastavlja rasti i razvija se rezistencija i na kombinaciju beta-laktamskog antibiotika s inhibitorom beta-laktamaze (24).

Metallo beta-laktamaze koje su kodirane genom *cfiA*, hidroliziraju beta-laktamski prsten svih beta-laktamskih antibiotika, uključujući i karbapeneme, kao što su meropenem i imipenem (58). Ekspresija gena *cfiA* može biti potpuno ili djelomično izražena, pa čak i posve izostati (engl. *silent gene*), što će rezultirati različitim stupnjem rezistencije na beta-laktamske antibiotike (59). Navedeni geni rezistencije većinom su kromosomski i konstitutivni. Unatoč postojanju ovih mehanizama

rezistencije, imipenem i cefoksitin su još uvijek vrlo djelotvorni u liječenju infekcija koje uzrokuje *B. fragilis*. Rezistencija na imipenem u Europi i SAD-u je podjednaka i iznosi manje od 1% (9, 56), dok u Japanu uopće nije zabilježena (60).

Smanjena propusnost vanjske membrane uslijed promjene porina otežava ulaz antibiotika u bakterijsku stanicu, tj. otežan je pristup citoplazmatskoj membrani (61). Primjer ove rezistencije je rezistencija na cefoksitin, gdje dolazi do gubitka proteina vanjske membrane veličine 50 kDa (10, 62).

Beta-laktamski antibiotici interferiraju sa sintezom peptidoglikana, najvažnije komponente stanične stijenke bakterija. Ciljno mjesto vezanja beta-laktamskih antibiotika su PBP molekule, koje imaju ulogu regulatornih enzima u završnoj fazi sinteze stanične stijenke. Ireverzibilna inhibicija PBP molekule sprječava poprečno umrežavanje N-acetil-glukozamina i N-acetil-muraminske kiseline, inače okosnice peptidoglikana, što rezultira smrću bakterijske stanice (39, 62).

1.3.2. Rezistencija na tetracikline

Tetraciklini se vežu za 30S podjedinicu ribosoma, te sprečavaju vezanje aminoacil-tRNA za ribosom. To će onemogućiti rast peptidnog lanca tijekom sinteze proteina, pa nastupa smrt bakterijske stanice (39, 63).

Rezistencija na tetraciklin najčešće je posljedica promjene ciljnog mjesta vezanja na ribosomu, djelovanjem proteina koji je kodiran genom *tetQ* (64-65).

Godine 2004. otkriven je u *Bacteroides* spp. novi gen, *tetX*. Vjerovalo se da je taj gen uključen u oksidaciju tetraciklina, no kako je aktivan samo u aerobnim uvjetima, inaktivacija antibiotika među anaerobnim bakterijama se smatrala upitnom (66).

Tigeciklin je sintetički analog tetraciklina i ubraja se u skupinu glicilciklina. Tigeciklin se veže za isto mjesto na ribosomu kao i tetraciklini, ali je afinitet tog vezanja veći (39). Iako je derivat tetraciklina, čini se da na njega ne djeluju isti mehanizmi rezistencije.

Međutim, jedna studija iz 2011. opisuje gene *tetQ*, *tetX* i *tetX1* i u izolatima *B. fragilis* grupe s povećanom vrijednošću MIC-a tigeciklina (67). Opisan mehanizam rezistencije na tigeciklin su produkti gena *tetX* i *tetX1*, koji djeluju kao FAD-ovisna oksigenaza, koja oštećuje antibiotik (67).

Tetraciklini su jedni od najmanje učinkovitih lijekova u liječenju infekcija koje uzrokuje *B. fragilis*, zbog nastanka djelomične ili potpune rezistencije (67). U Japanu je 86% izolata rezistentno na tetraciklin (60), a u Brazilu 68% (15).

Za razliku od tetraciklina, rezistencija na tigeciklin je vrlo niska i iznosi prema dvjema europskim studijama 1%, odnosno 1,7 % (56, 68).

1.3.3. Rezistencija na eritromicin

Eritromicin je antibiotik iz skupine makrolida. Makrolidi se vežu za 23S rRNA na 50S podjedinici ribosoma i interferiraju s procesom translacije (39).

Rezistencija na makrolide nastaje metilacijom receptora na 23S rRNA, čime se smanjuje afinitet vezanja antibiotika za 50S podjedinicu ribosoma. Ovaj tip rezistencije posljedica je djelovanja gena *ermF*, koji pripada tzv. MLS_B (makrolidi-linkozamidi-streptogramini B) obitelji gena (69). Rezistencija na eritromicin je često udružena s rezistencijom na tetraciklin, jer se geni rezistencije nalaze na istom mobilnom genetičkom elementu (69).

1.3.4. Rezistencija na klindamicin

Klindamicin je antibiotik iz skupine linkozamida. Linkozamidi su vrlo slični makrolidima po mehanizmu djelovanja i mehanizmu rezistencije (MLS_B tip rezistencije) (39).

Rezistencija na klindamicin posljedica je djelovanja gena *ermB*, *ermF* i *ermG*, koji interferiraju s vezanjem antibiotika za ciljno mjesto na ribosomu (69) ili gena *msrSA* i *mefA* koji su uključeni u mehanizam tzv. *efflux*-pumpe (70).

Klindamicin je jedan od najčešće korištenih antibiotika u liječenju infekcija uzrokovanim bakterijom *B. fragilis* (71).

Rezistencija *B. fragilis* na klindamicin u Europi iznosi oko 26% (56, 71), u Japanu 33% (60), a u SAD-u oko 35% (9).

1.3.5. Rezistencija na moksifloksacin

Moksifloksacin je antibiotik iz skupine kinolona. Kinoloni djeluju inhibitorno na bakterijsku DNK girazu i time sprječavaju nastanak definitivne uzvojnice DNK, pa nastupa smrt bakterijske stanice.

Rezistencija na moksifloksacin posljedica je aktivnog izbacivanja lijeka (takozvani efluks) iz bakterijske stanice ili promjene ciljnog mjesta vezanja (72-73).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Opći ciljevi

Opći ciljevi istraživanja su sljedeći:

- identificirati vrste *Bacteroides fragilis* grupe
- odrediti antimikrobnu osjetljivost sojeva *B. fragilis* grupe na metronidazol i ostala antimikrobna sredstva koja se koriste u liječenju infekcija uzrokovanim anaerobnim bakterijama
- detektirati i odrediti učestalost *nim* gena rezistencije na metronidazol u sojevima *B. fragilis* grupe
- tipizirati *nim* gene rezistencije na metronidazol u sojevima *B. fragilis* grupe
- *in vitro* inducirati rezistenciju na metronidazol u sojevima koji su fenotipski osjetljivi na metronidazol

2.2. Specifični ciljevi

Specifični ciljevi istraživanja su sljedeći:

- implementirati PCR metodu za dokaz *nim* gena koji kodira rezistenciju na metronidazol u rutinski rad mikrobiološkog laboratorija kao dodatak testu osjetljivosti na antimikrobna sredstva
- izraditi postupnik za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti klinički značajnih anaerobnih bakterija
- potaknuti razvoj brzih molekularnih testova za detekciju gena rezistencije

3. HIPOTEZA

U sojevima *Bacteroides fragilis* grupe koji imaju *nim* gen, *nimA* će biti najčešći tip gena, a MIK metronidazola viši u odnosu na sojeve bez *nim* gena.

U dijelu sojeva *B. fragilis* grupe koji su *nim* gen pozitivni, a fenotipski osjetljivi na metronidazol inducirat će se rezistencija na metronidazol, s vrijednostima MIK-a ≥ 256 mg/L i biti stabilna.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Mikroorganizmi

4.1.1.1. Klinički izolati

Ispitivanje je provedeno na 155 sojeva *Bacteroides fragilis* grupe iz zbirke, koji su izolirani iz uzoraka različitih vrsta kliničkog materijala (hemokultura, intraoperativni uzorak tkiva, ascites, obrisak i aspirat rane, sadržaj apscesa, punktat, sadržaj drena) bolesnika liječenih u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb.

Uzorci su prikupljeni tijekom razdoblja veljača 2012. - rujan 2014., isključivo prema kliničkim indikacijama u kojima se očekivala izolacija anaerobnih bakterija.

4.1.1.2. Standardni sojevi

Tijekom izvedbe klasičnih, mikrobioloških, te molekularno-genetičkih metoda u svrhu identifikacije bakterijskih vrsta, ispitivanja antimikrobne osjetljivosti, detekcije gena rezistencije i mjerenja aktivnosti laktat dehidrogenaze, korišteni su sljedeći standardni sojevi za kontrolu kvalitete:

B. fragilis ATCC 25285 i *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741;

B. fragilis 638R(pIP417) (*nimA*), *B. fragilis* BF-8 (*nimB*), *B. fragilis* 638R(pIP419) (*nimC*), *B. fragilis* 638R(pIP421) (*nimD*) i *B. fragilis* 388 (*nimE*), te NCTC 9343.

4.1.2. Hranjive podloge

Tijekom rada korišteni su komercijalno dostupni dehidrirani pripravci za pripremu hranjivih podloga prema uputi proizvođača:

- BBL Columbia Agar Base, BD
- BBL Brucella Agar, BD
- BBL Brucella Broth, BD
- BBL Brain Heart Infusion Broth, DB
- BBL Chocolate II Agar, BD
- BBL Blood Agar Base (Infusion Agar), BD

4.1.3. Kemikalije i reagensije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije i reagensije:

- ovčja krv, Biognost
- hemin BioXtra, Sigma-Aldrich
- vitamin K₁ Konakion MM, Roche
- kristalviolet, Kemika
- kalijev-jodid, Kemika
- karbolfuksin, Kemika
- etilni alkohol 96%, Kemika
- PCR Master-Mix, Roche
- PCR H₂O, Roche
- parovi početnica za gene *nim* (A-E), *cepA*, *cfiA*, *ermF*, *tetQ*; Sigma-Aldrich
- agaroza *low EEO*, Sigma-Aldrich
- molekularni marker (100 bp) u rasponu 100-1500 bp, Roche
- molekularni marker (100 bp) u rasponu 100-600 bp, Qiagen
- 1xTAE pufer
- etidijev bromid; Boehringer
- *Loading* pufer, Roche
- MALDI-TOF *matrix*, Bruker Daltonics
- kit API 20A, bioMérieux
- kit Quant-iT Protein, Life Technologies
- GENbox vrećice za anaerobnu atmosferu, bioMérieux

4.1.4. Antimikrobna sredstva

Tijekom rada korištena su sljedeća antimikrobna sredstva:

- ampicilin Pan Ampicilline (500 mg), Pan Pharma
- amoksisicilin s klavulanskom kis. Klavocin (1,2 g), Pliva
- piperacilin s tazobaktamom Pipertaz (4,5 g), Sandoz
- imipenem s cilastatinom Tienam (500 mg+500 mg), MSD
- klindamicin Clindamycin (600 mg/4 mL), MIP Pharma
- moksifloksacin Avelox (400 mg/250 mL), Bayer
- tigeciklin Tygacil (10 mg/mL), Pfizer
- metronidazol Medazol (0,5% 100 mL), Belupo
- metronidazol disk sadržaj diska 5 µg, Oxoid

4.1.5. Aparatura i pribor

Tijekom rada korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- *mini API*, bioMérieux
- maseni spektrometar MALDI-TOF Biotyper, Microflex serija, Bruker Daltonics
- termalni *cycler* GeneAmp, PCR System 9700, Applied Biosystems
- bakteriološki termostad, Inko
- ledenica HERAfreeze HFU B (–86 °C), Thermo Scientific
- ledenica (–20 °C), LTH
- autoklav, MMM Münchener Medizin Mechanik
- *laminar air flow* kabinet, pbi international
- aparat za elektroforezu, Elchrom Scientific EPS 150/2000
- kadica za elektroforezu *Green-Range*, Scie-Plas
- aparat za vizualizaciju umnoženog fragmenta DNK, UV *transilluminator*, UVItec
- vodena kupelj Precistern, P. Selecta
- ultrazvučni homogenizator, MSE
- mikroskop BX51, Olympus
- centrifuga 5418, Eppendorf
- termomikser Comfort, Eppendorf
- vibro-mješalica TK3S, tecnoKartell
- denzitometar Densimat, bioMérieux
- pH-indikatorski papir, Merck
- automatske pipete 10, 100 i 1000 µL, Eppendorf
- nastavci za pipete s i bez filtera, Greiner Bio-One
- plastične Petrijeve zdjelice, ø 90 mm, Jari
- lonac za anaerobnu atmosferu 7 L, Thermo Scientific
- plastične kivete s poklopcem 0,2 i 1,5 mL, Greiner Bio-One
- UV transparentne plastične kivete 1 ml, Merck
- jednokratne eze 1 i 10 µL, Biosigma
- stakleno laboratorijsko posuđe, Tlos
- stalak za epruvete, Tlos

4.2. METODE

4.2.1. Izolacija bakterijskih sojeva

Inokulirati Columbia krvni agar uzorcima kliničkog materijala.

Inokulirane podloge inkubirati na 35 °C tijekom 48 h u anaerobnim uvjetima, uporabom lonca i GENbox vrećice, koji su namijenjeni postizanju anaerobne atmosfere.

4.2.2. Pohrana sojeva u čistoj kulturi

Izolirane sojeve u čistoj kulturi pohraniti u Brucella bujon, na temperaturi –80 °C, do uporabe.

4.2.3. Identifikacija bakterijskih vrsta

Poraslu kulturu podvrgnuti testu aerotolerancije, koji razlikuje striktne od fakultativnih anaerobnih bakterija.

Od kolonija striktnih anaerobnih bakterija, napraviti mikroskopski preparat obojen po Gramu i brzi test katalaze.

Striktne gram-negativne anaerobne bakterije oblika štapića identificirati uporabom komercijalnog testa za identifikaciju anaerobnih bakterija, API 20A ili u slučaju dvojbenog rezultata masenom spektrometrijom, MALDI-TOF.

4.2.3.1. Test aerotolerancije

Test služi za razlučivanje striktnih od fakultativnih anaerobnih bakterija.

Dio porasle kolonije pikirati bakteriološkom ušicom i razvući po površini označenog sektora na Columbia krvnom agaru, a drugi dio iste kolonije po površini sektora na čokoladnom agaru.

Inokulirane podloge inkubirati na 35 °C tijekom 24 h u odgovarajućim uvjetima: Columbia krvni agar u anaerobnim uvjetima, a čokoladni agar na atmosferskom zraku.

Kolonije striktnih anaerobnih bakterija će porasti samo na Columbia krvnom agaru, a kolonije fakultativnih anaerobnih bakterija i na Columbia i na čokoladnom agaru (1).

4.2.3.2. Bojenje po Gramu

Bojenje po Gramu je jedna od metoda bojenja bakterija, nazvana po danskom bakteriologu Hansu Christianu Gramu, kojom bakterije dijelimo na gram-pozitivne ili gram-negativne.

Dio porasle kulture nanijeti u tankom sloju bakteriološkom ušicom na predmetno stakalce, osušiti na zraku i fiksirati plamenom.

Preparat prelići prvom bojom – kristalviolet.

Dodati kalijev-jodid, koji veže boju za staničnu stijenu bakterija.

Odbojavati etilnim alkoholom 96%, pa isprati vodom.

Preliti kontrastnom bojom – karbolfuksin, te ponovno isprati vodom.

Obojeni preparat osušiti na zraku.

Dodati kap imerzijskog ulja (cedrovo ulje ili anisol) i mikroskopirati uz imerzijski objektiv (povećanje 100x).

Gram-pozitivne bakterije ostanu plavo-ljubičaste, a gram-negativne postanu crvene (33).

4.2.3.3. Test katalaze

Test ispituje proizvodi li soj enzim katalazu, čija je uloga antioksidativna zaštita mikroorganizma. Katalaza razlaže toksični vodikov peroksid (H_2O_2) na molekule kisika i vode.

Dio porasle kulture nanijeti bakteriološkom ušicom na predmetno stakalce i dodati 1-2 kapi 3% H_2O_2 . Katalaza-pozitivne bakterije oslobađaju kisik, pa se na predmetnom stakalcu pojave mjehurići (74).

4.2.3.4. API 20A

Komercijalni test od 20 takozvanih mikrotubica s dehidriranim supstratima koji se rekonstituiraju ukapavanjem bakterijske suspenzije. Tijekom inkubacije, metaboličkim procesima nastaju promjene boje, koje su spontane ili se uoče uz dodatak odgovarajućeg reagensa.

U medij ampule API 20 A *Medium*, pomoću bakteriološke ušice dodati dio porasle kulture do gustoće bakterijske suspenzije 3 McFarland, izmjerene denzitometrom. Pripremljenom suspenzijom ispuniti samo donji dio mikrotubice svih testova, osim testa GEL, čiju mikrotubicu treba ispuniti u cijelosti. U kupolu mikrotubice prvog testa IND, potrebno je nakapati i mineralno ulje.

Nakon 24 sata inkubacije u anaerobnim uvjetima na 35 °C, u mikrotubicu testa IND dodati jednu kap XYL reagensa, a nakon 2-3 min uz miješanje još i jednu kap EHR reagensa.

U mikrotubicu testova od GLY do TRE dodati po jednu kap BCP reagensa.

Reakcije očitati prema tablici u priloženoj uputi za izvedbu testa.

Za interpretaciju testa potrebno je napraviti i test katalaze, te mikroskopski preparat obojen po Gramu.

Identifikacija vrste postiže se konačno *mini API* instrumenom, koji uspoređuje specifičan biokemijski profil s profilima u postojećoj bazi podataka.

4.2.3.5. MALDI-TOF masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase i naboja (38).

MALDI-TOF MS (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-vrijeme leta) obuhvaća djelovanje lasera na uzorak otopljen u matrici, koji potom ionizira. Nastali ioni ubrzavaju se u TOF analizatoru djelovanjem električnog polja i razdvajaju prema masi i naboju. Lakši ioni jače ubrzavaju i prvi dolaze do detektora. Za nastalu sliku prostorne raspodjele molekula, uglavnom proteina, traži se podudarni profil u postojećoj bazi podataka, a nalazom podudarnog profila identificira se mikroorganizam do razine vrste za svega nekoliko minuta.

Dio porasle kolonije nanijeti vrhom tankog štapića (npr. drvena čačkalica) po označenom kružiću na metalnoj pločici, pa dodati 1 μ L matrice i osušiti na zraku.

Upisati uzorak u računalnu aplikaciju i označiti njegovu poziciju na pločici.

Pritisnuti dugme *In/Out* na aparatu, a nakon pojave zelenog svjetlosnog signala u području *Access*, podignuti poklopac i umetnuti metalnu pločicu u aparat. Ponovno pritisnuti dugme *In/Out* i pričekati zeleni svjetlosni signal. Nakon pojave zelenog svjetlosnog signala odabrati opciju *Finish* na računalu i pričekati rezultat identifikacije.

4.2.4. Testiranje osjetljivosti na antimikrobna sredstva

4.2.4.1. Metoda dilucije u agaru

Metoda dilucije u agaru je kvantitativna metoda kojom se testira osjetljivost bakterija na antibiotike i određuje minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotika, koja zaustavlja rast bakterija.

Modifikacija dilucijske metode je metoda prijelomne točke, koja koristi samo nekoliko razrjeđenja antibiotika, i to u uskom rasponu oko točke MIK-a.

Kvantitativnom dilucijskom metodom u agaru (75-76) testirat će se osjetljivost na sljedeća antimikrobna sredstva:

- ampicilin (AMP),
- amoksisicilin s klavulanskom kiselinom (AMC),
- piperacilin s tazobaktamom (TZP),
- imipenem s cilastatinom (IMI),
- klindamicin (CLI),
- moksifloksacin (MOX),
- tigeciklin (TGC) i
- metronidazol (MET).

Za sojeve s induciranom rezistencijom na metronidazol pripremljen je cijeli niz razrjeđenja metronidazola, a u slučaju ostalih antibiotika uzak raspon koncentracija oko točke MIK-a.

Za sve ostale izolate pripremljen je uzak raspon koncentracija oko točke MIK-a za sve ispitivane antibiotike (AMP: 0,5 i 4 mg/L; AMC 4 i 16 mg/L, TZP 8 i 32 mg/L; IMI 2 i 16 mg/L; CLI 4 i 8 mg/L; MOX 2 i 8 mg/L; TGC 4 i 16 mg/L i MET 4 i 8 mg/L).

Pamučnim brisom pikirati dio porasle kulture na Columbia krvnom agaru i razmutiti u svježe pripremljenom Brucella bujonu do gustoće bakterijske suspenzije 0,5 McFarland, izmjerene denzitometrom.

Svako pojedino antimikrobno sredstvo rekonstituirati prema uputi proizvođača i koristiti za pripremu polazne koncentracije (*stock*), te niza dvostrukih razrjeđenja prema dokumentu CLSI M11-A7, 2007. (77) (Tablica 1.).

Tablica 1. Izračun niza dvostrukih razrjeđenja antibiotika, koji je inkorporiran u podlogu za izradu antibiograma

Antimikrobna otopina					Koncentracija (µg/mL)		
Korak	Koncentracija (µg/mL)	Izvor	Volumen (mL)	Otapalo (mL)	Intermedijarna	U agaru 1:10	Log2
	5120	Stock			5120	512	9
1	5120	Stock	2	2	2560	256	8
2	5120	Stock	1	3	1280	128	7
3	5120	Stock	1	7	640	64	6
4	640	Korak 3	2	2	320	32	5
5	640	Korak 3	1	3	160	16	4
6	640	Korak 3	1	7	80	8	3
7	80	Korak 6	2	2	40	4	2
8	80	Korak 6	1	3	20	2	1
9	80	Korak 6	1	7	10	1	0
10	10	Korak 9	2	2	5	0,5	-1
11	10	Korak 9	1	3	2,5	0,25	-2
12	10	Korak 9	1	7	1,25	0,125	-3

Tikvicu sa svježe pripremljenim i autoklaviranim Brucella agarom odložiti u vodenu kupelj na 50 °C, te nakon određenog vremena dodati ovčju krv (5%), hemin (5 mg/L) i vitamin K₁(1 mg/L). U Petrijeve zdjelice uliti po 18 ml Brucella krvnog agara i dodati po 2 mL antibiotika određene koncentracije. Dobro izmiješati sadržaj pomicanjem ploče kružnim pokretima po podlozi i ostaviti agar da se potpuno ohladi i skrutne. Tako pripremljene podloge nasaditi isti dan ili pohraniti u hladnjak na 4 °C, najduže 72 h. Ploče koje sadrže amoksisicilin s klavulanskom kiselinom ili imipenem koristiti na dan pripreme podloga.

Na označeno mjesto za svaki pojedini uzorak na ploči s antibiotikom nakapati 1-2 µL bakterijske suspenzije, što odgovara $\sim 1 \times 10^5$ cfu/spot, počevši s pločom s najnižom koncentracijom antibiotika. Nakon 10-tak min, kada se inokulum apsorbira u agar, okrenuti ploču i pohraniti u anaerobne uvjete, na 35 °C tijekom 42-48 h.

Potrebno je inokulirati i Brucella krvni agar bez antibiotika, te običan krvni agar. Inokulacija Brucella krvnog agara bez antibiotika provodi se u svrhu kontrole rasta soja, a običnog krvnog agara radi provjere moguće kontaminacije uzorka aerobnim, odnosno fakultativno-anaerobnim bakterijama.

Nakon završene inkubacije, usporediti rast soja na podlozi s antibiotikom s rastom soja na podlozi bez antibiotika, pa odrediti MIK kao onu najnižu koncentraciju antibiotika na kojoj je značajno reduciran rast soja. Reduciran rast soja obuhvaća situacije poput izostanka porasta; rasta soja u obliku tzv. fine maglice (engl. haze), jedne jedine ili više sitnih kolonija (76).

Rezultate testiranja antimikrobne osjetljivosti na AMP, AMC, TZP, IMI, CLI i MET interpretirati prema EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (78), v 6.0 2016, a na MOX i TGC prema CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (77) standardu.

Standardne sojeve *B. fragilis* ATCC 25285 i *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 koristiti kao kontrolne sojeve.

4.2.4.2. Metoda disk-difuzije

Ispitati preliminarnu osjetljivost na metronidazol (sadržaj diska 5 µg, Oxoid) nestandardiziranom metodom disk-difuzije na svježe pripremljenom, obogaćenom Brucella krvnom agaru i interpretirati rezultate prema literaturnom navodu (14).

Soj čija zona inhibicije oko diska metronidazola iznosi ≥ 28 mm, interpretirati osjetljivim.

4.2.5. Indukcija rezistencije na metronidazol

Nasumično izabrane sojeve *B. fragilis* grupe, koji su osjetljivi na metronidazol i negativni na *nim* gen rezistencije, izlagati postepeno sve većim koncentracijama metronidazola, inkorporiranog u podlogu, Brucella krvni agar (27).

Postupak započeti koncentracijom koja je za jedno razrjeđenje manja od vrijednosti MIK-a, pa nastaviti koncentracijama koje su dvostruko, četverostruko ili više puta veće od MIK-a metronidazola, konačno do one najveće koncentracije na kojoj ispitivani soj još uvijek raste.

Pojedine sojeve u kojih se teško inducira rezistencija potrebno je izlagati koncentracijama koje odgovaraju tek polovici viših susjednih vrijednosti koncentracija u nizu dvostrukih razrjeđenja antibiotika.

Soj izlagati antibiotiku na način da se isti ezom razvuče u tri smjera po površini agara pripadajućeg sektora na ploči, u obliku tzv. mrežice.

Ukoliko ni nakon tri pokušaja induciranja rezistencije na određenoj koncentraciji nema porasta soja, kao konačnu koncentraciju u induciranog soja uzeti prvu manju koncentraciju na kojoj porast još uvijek postoji.

Primjeri izračuna pojedinih koncentracija:

ako *stock* metronidazola iznosi 5000 µg/mL, odnosno 3750 µg/0,75 mL, izračun za npr. koncentraciju 80 µg/mL je:

$3750:80=46,875$; $46,875-0,75=46,125$; dakle 750 µL antibiotika (*stock*) potrebno je pomiješati s 46,125 (46,13) mL otapala.

Upola manja koncentracija, 40 µg/mL, dobiva se miješanjem jednakog volumena antibiotika koncentracije 80 µg/mL i otapala, a koncentracija između dviju navedenih vrijednosti, tj. koncentracija 60 µg/mL, na sljedeći način:

$80:60=1,33$. Za volumen npr. 10 mL; $10:1,33=7,52$ mL (koncentracija antibiotika 80 µg/mL), koja se pomiješa s 2,48 mL otapala.

Volumen dotične koncentracije antibiotika ovisi o broju potrebnih ploča s podlogom, tj. o broju sojeva koji se izlažu indukciji rezistencije.

Ploče s podlogom i inkorporiranim antibiotikom pripremiti na način koji se nalazi u opisu testiranja osjetljivosti na antimikrobna sredstva, metodom dilucije u agaru.

Stabilnost rezistencije ispitati na način da se inducirani soj tri puta uzastopno supkultivira na Brucella krvni agar bez metronidazola, a potom na Brucella krvni agar

s metronidazolom, i to one koncentracije koja je postignuta u procesu indukcije rezistencije.

Sojevi sa stabilnom rezistencijom će ponovno rasti na podlozi s antibiotikom.

4.2.6. Mjerenje aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH)

Laktat dehidrogenaza (LDH) je oksidoreduktazni enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju pretvorbe piruvata u laktat. Pretvorbom piruvata u laktat oksidira se nikotinamid adenin dinukleotid hidrat (NADH). Oksidacija NADH dovodi do redukcije koncentracije NADH, a posljedično i redukcije apsorbancije na 340 nm, jer jedino NADH, a ne NAD, ima sposobnost apsorpcije svjetlosti te valne duljine.

Jedinica enzimatske aktivnosti odraz je oksidacije jednog μmol NADH po minuti.

Inokulirati po osam mL *Brain Heart Infusion* bujona obogaćenog s 0,25% ekstrakta kvasca, 10 mg/L hemina i 1 mg/L vitamina K₁ induciranim i neinduciranim sojevima, te inkubirati u termostatu na 35 °C do postizanja stacionarne faze rasta. U slučaju neinduciranih sojeva preko noći, a induciranih tijekom 72 h. Sojeve izložiti podlozi s metronidazolom (16 mg/L za inducirane i 0,125 mg/L za neinducirane sojeve), te podlozi bez metronidazola.

Bujonske kulture ohladiti pomoću leda, te ih centrifugirati na 4 °C tijekom 15 min na 3000 rpm. Isprati u 3 mL pufera 40 mM NaPO₄, pH 7,0 i ponovno centrifugirati pri istim uvjetima, ali tijekom 5 min. Dobiveni talog resuspendirati u prethodno navedenom puferu, te podvrgnuti sonifikaciji. Centrifugirati na 4 °C tijekom 10 min na 3000 rpm kako bi se uklonio ostatak stanica, pa izmjeriti sadržaj proteina pomoću fluorometra Qubit i Quant-iT kompleta za određivanje proteina.

Test izvesti u duplikatu, u UV transparentnim plastičnim kivetama volumena 1 mL, koje sadrže 20 mM Na-piruvata, 0,24 mM reduciranog nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) i 20-40 μL dobivenog pripravka enzima.

Do linearne promjene apsorbancije na 340 nm dolazi tijekom 10 min inkubacije uz 50 mM MOPS pufer, pH 6,8 (79) (Tablica 9.).

4.2.7. Probir na gene rezistencije

4.2.7.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK)

Bakteriološkom ušicom pikirati više poraslih kolonija na površini Columbia krvnog agara i suspendirati u 100 µL destilirane i sterilizirane vode.

Inkubirati na 95–99 °C tijekom 10 min.

Centrifugirati na 14000 rpm tijekom 2 min (25).

Supernatant koji sadrži izoliranu DNK premjestiti u drugu kivetu i pohraniti na –20 °C do uporabe.

4.2.7.2. Umnožavanje regije DNK od interesa

4.2.7.2.1. *nim* geni rezistencije

Probir na *nim* gen rezistencije provesti metodom lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) u DNK-termobloku.

Kao DNK-kalup koristiti DNK bakterijskih stanica, koja je izolirana postupkom opisanom u točki 4.2.7.1 (20, 25).

Za umnožavanje fragmenta DNK molekule veličine 458 bp, koristiti univerzalni par oligonukleotidnih početnica za *nim* gen:

nim3 (5'-ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGCG-3') i

nim5 (5'-GCTTCCTTGCCTGTCATGTGCTC-3').

Reakcijsku smjesu volumena 20 µL, koja sadrži Master Mix (Roche) (10 µL), PCR H₂O (7,2 µL), uzorak izolirane DNK (2 µL) i po 0,4 µL oligonukleotidnih početnica, rekonstituiranih prema uputi proizvođača, izložiti procesima inicijalne denaturacije, umnožavanja i finalne ekstenzije.

Inicijalna denaturacija odvija se na 94 °C tijekom 10 min. Umnožavanje fragmenta DNK kroz 35 ciklusa odvija se ponavljanjem sljedećih reakcija:

- razdvajanje dvostrukog DNK lanca (denaturacija) na 94 °C tijekom 30 s
- "lijepljenje" oligonukleotidnih početnica na komplementarnu sekvencu DNK (engl. *annealing*) na 62 °C tijekom 1 min
- produljivanje početnica djelovanjem enzima DNK polimeraze (ekstenzija) na 72 °C tijekom 1 min

Finalna ekstenzija odvija se na temperaturi 72 °C tijekom 10 min.

Standardne sojeve *B. fragilis* 638R(pIP417) (*nimA*), *B. fragilis* BF-8 (*nimB*), *B. fragilis* 638R(pIP419) (*nimC*), *B. fragilis* 638R(pIP421) (*nimD*) i *B. fragilis* 388 (*nimE*) koristiti kao pozitivne kontrolne sojeve, a *B. fragilis* ATCC 25285 kao negativan kontrolni soj.

4.2.7.2.2. *cepA*, *cfiA*, *ermF* i *tetQ* geni rezistencije

Probir na *cepA*, *cfiA*, *ermF* i *tetQ* gene rezistencije PCR metodom provesti u DNK termobloku (20).

Za umnožavanje željenog fragmenta DNK molekule koristiti odgovarajući par oligonukleotidnih početnica uz odgovarajuće uvjete PCR reakcije (Tablica 2.), uz inicijalnu denaturaciju na 94 °C, tijekom 10 min i finalnu ekstenziju na 72 °C, tijekom 10 min.

Reakcijska smjesa volumena je 20 µL i sadrži Master Mix (Roche) (10 µL), PCR H₂O (7,2 µL), uzorak izolirane DNK (2 µL) i po 0,4 µL oligonukleotidnih početnica, rekonstituiranih prema uputi proizvođača.

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije za pojedine gene rezistencije (nim (A-E), cepA, cfiA, ermF, tetQ)

Početnice	Broj ciklusa/ uvjeti PCR reakcije	Ciljna sekvenca	Veličina umnoženog fragmenta (bp)	Referenca
nim3 ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGCG	35/ 94°C 30", 62°C 1', 72°C 1'	<i>nim</i> (A-E) gen	458	Nakano, 2011
nim5 GCTTCCTTGCTGTCATGTGCTC				
cepA1 TTCTGCTATGTCCTGCCC	35/ 94°C 1', 52°C 1', 72°C 1'	<i>cepA</i> gen	780	Nakano, 2011
cepA2 ATCTTTCACGAAGACGGC				
cfiA1 ATGGTACCTTCCAACGGG	35/ 94°C 1', 56°C 1', 72°C 1'	<i>cfiA</i> gen	~350	Nakano, 2011
cfiA2 CACGATATTGTCGGTCGC				
ermF1 CGGGTCAGCACTTTACTATTG	35/ 94°C 30", 50°C 30", 72°C 2'	<i>ermF</i> gen	~500	Nakano, 2011
ermF2 GGACCTACCTCATAGACAAG				
tetQ1 ACTTCCGTAACCGAGAATCTGCTG	40/ 94°C 1', 50°C 1', 72°C 40"	<i>tetQ</i> gen	~600	Nakano, 2011
tetQ2 TACCGGATAGACTTTGGCTTTTGC				

4.2.7.3. Detekcija produkta umnoženog PCR-om

Detekciju produkta umnoženog PCR-om provesti postupkom elektroforeze u 2% agaroznom gelu.

Po završetku PCR reakcije, staviti po 10 µL reakcijske smjese i 1 µL *Loading* pufera, razrjeđenja 1:1 u jažice agaroznog gela, osim jažice za molekularni marker. U jažicu za molekularni marker staviti 1 µL molekularnog markera, 1 µL *Loading* pufera i 8 µL vode.

Postupak elektroforeze provesti uz napon struje od 100 V, 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) i u trajanju od 60 min.

Po završetku elektroforeze inkubirati gel u otopini etidij-bromida (0,5 µg/mL) tijekom 5 min, zatim ga odbojavati u vodi tijekom 5 min, te izložiti ultraljubičastom svjetlu na aparatu za vizualizaciju umnoženog produkta DNK (UV *transilluminator*) i fotografirati.

5. REZULTATI

Ukupno je prikupljeno 155 sojeva *B. fragilis* grupe.

Najbrojnija vrsta je bila *B. fragilis* [97 (62,6%)].

Ostale vrste prema učestalosti su: *B. vulgatus* [19 (12,3%)], *B. thetaiotaomicron* [16 (10,3%)], *B. ovatus* [9 (5,8%)], *B. uniformis* [4 (2,6%)] i *B. distasonis* [4 (2,6%)], *B. caccae* [3 (1,9%)], *B. stercoris* [2 (1,3%)] i *B. salyersiae* [1 (0,6%)].

Svih 155 izolata je bilo osjetljivo na metronidazol (MET).

Zona inhibicije oko diska MET (5 µg) je iznosila ≥ 28 mm, a MIK MET ≤ 4 mg/L.

Niti u jednom od ukupno 155 izolata nije detektiran *nim* (A-E) gen rezistencije.

Reprezentativnom uzorku od ukupno 60 izolata (22 *B. fragilis* i 38 *B. non-fragilis*) određena je antimikrobna osjetljivost i na ostala antimikrobna sredstva [ampicilin (AMP), amoksicilin i klavulanska kiselina (AMC), piperacilin i tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), klindamicin (CLI), miksifloksacin (MOX) i tigeciklin (TGC)], te je učinjen probir i na ostale gene rezistencije (*cepA*, *cfiA*, *ermF*, *tetQ*) (Tablice 3. i 4.).

Rezultati testiranja antimikrobne osjetljivosti na MET, AMP, AMC, TZP, IMI i CLI su interpretirani prema EUCAST v 6.0 (78), a MOX i TGC prema CLSI M100-S24 (77) standardu.

Tablica 3. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika i geni rezistencije svakog pojedinog *B. fragilis* izolata

Oznaka <i>B. fragilis</i> izolata u zbirci	MIK (mg/L)								Nim (A-E)	cepA	cfiA	ermF	tetQ
	MET	AMP	AMC	TZP	IMI	CLI	MOX	TGC					
15	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
16	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
32	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	ermF	tetQ
41	≤4	2	≤4	16	8	≥8	≤2	≤4	-	-	cfiA	-	tetQ
45	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	-
49	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
53	≤4	≥4	8	≤8	≤2	≤4	≤2	≤4	-	cepA	-	-	-
54	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
62	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
92	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≤4	≤2	8	-	cepA	-	-	tetQ
98	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
100	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	ermF	tetQ
103	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	ermF	tetQ
113	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
119	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	ermF	tetQ
124	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	-
143	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
182	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
183	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	-
184	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
190	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
191	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≤4	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ

Vrijednosti MIK-a metronidazola (MET), ampicilina (AMP), amoksicilina i klavulanske kiseline (AMC), piperacilina i tazobaktama (TZP), imipenema (IMI) i klindamicina (CLI) interpretirani su prema EUCAST v 6.0, (78) a moksifloksacina (MOX) i tigeciklina (TGC) prema CLSI M100-S24 (77) standardu.

S = osjetljivo, I = umjereno rezistentno, R = rezistentno.

MET S≤4, R>4; AMP S≤0,5, I=1-2, R>2; AMC S≤4, I=8, R>8; TZP S≤8, I=16, R>16; IMI S≤2, I=4-8, R>8; CLI S≤4, R>4; MOX S≤2, I=4, R≥8; TGC S≤4, I=8, R≥16.

Vrijednosti MIK-a otisnute masnim slovima označavaju rezistenciju.

nim(A-E), cepA, cfiA, ermF, tetQ - geni rezistencije.

Tablica 4. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika i geni rezistencije svakog pojedinog *B. non-fragilis* izolata

Oznaka izolata u zbirci	Vrsta izolata	MIK (mg/L)								Nim (A-E)	cepA	cfiA	ermF	tetQ
		MET	AMP	AMC	TZP	IMI	CLI	MOX	TGC					
1	<i>B. vulgatus</i>	≤4	2	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	8	-	-	-	ermF	tetQ
2	<i>B. distasonis</i>	≤4	2	≥16	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
3	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≤4	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
5	<i>B. salyersiae</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
6	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	4	≤4	-	-	-	-	-
9	<i>B. ovatus</i>	≤4	≤0.5	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	-
10	<i>B. caccae</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	8	-	-	-	-	tetQ
19	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
22	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	4	8	-	cepA	-	ermF	tetQ
23	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
35/2	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
37	<i>B. uniformis</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
39	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
40	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
42	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	8	16	8	≥8	≥8	≤4	-	-	-	-	tetQ
43	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≤4	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
44	<i>B. stercoris</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
46	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	8	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
51	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
57	<i>B. vulgatus</i>	≤4	2	≤4	≤8	≤2	≤4	≤2	≤4	-	-	-	-	-
59	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≥16	16	≤2	≥8	4	≤4	-	cepA	-	ermF	tetQ
60	<i>B. caccae</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	4	8	-	-	-	-	tetQ
61	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
67	<i>B. caccae</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	4	8	-	-	-	ermF	tetQ
70	<i>B. vulgatus</i>	≤4	2	≤4	≤8	≤2	≤4	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
73	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	-	tetQ
74	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≤4	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
75	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
76	<i>B. distasonis</i>	≤4	2	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
77	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	≥8	≥16	-	-	-	-	tetQ
78	<i>B. vulgatus</i>	≤4	2	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
88	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	-
89	<i>B. uniformis</i>	≤4	≥4	8	16	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
90	<i>B. vulgatus</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
93	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≤2	≤4	-	cepA	-	-	tetQ
94	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≥16	16	≥16	≥8	4	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
95	<i>B. thetaiota-omicron</i>	≤4	≥4	≤4	≤8	≤2	≥8	≥8	≤4	-	-	-	ermF	tetQ
101	<i>B. ovatus</i>	≤4	≥4	≥16	16	≤2	≥8	4	≤4	-	-	-	ermF	tetQ

Vrijednosti MIK-a metronidazola (MET), ampicilina (AMP), amoksicilina i klavulanske kiseline (AMC), piperacilina i tazobaktama (TZP), imipenema (IMI) i klindamicina (CLI) interpretirani su prema EUCAST v 6.0, (78) a moksifloksacina (MOX) i tigeciklina (TGC) prema CLSI M100-S24 (77) standardu.

S = osjetljivo, I = umjereno rezistentno, R = rezistentno.

MET $S \leq 4$, $R > 4$; AMP $S \leq 0,5$, $I = 1-2$, $R > 2$; AMC $S \leq 4$, $I = 8$, $R > 8$; TZP $S \leq 8$, $I = 16$, $R > 16$; IMI $S \leq 2$, $I = 4-8$, $R > 8$; CLI $S \leq 4$, $R > 4$; MOX $S \leq 2$, $I = 4$, $R \geq 8$; TGC $S \leq 4$, $I = 8$, $R \geq 16$.

Vrijednosti MIK-a otisnute masnim slovima označavaju rezistenciju.

nim(A-E), *cepA*, *cfiA*, *ermF*, *tetQ* - geni rezistencije.

5.1. Osjetljivost na ostala antimikrobna sredstva

Rezultati ispitivanja osjetljivosti na ostala antimikrobna sredstva sojeva *B. fragilis* grupe prikazani su u Tablicama 3-5. i Dijagramu 1.

Na ampicilin je osjetljiv 1 (1,7%) izolat, umjereno su rezistentna 7 (11,7%), a rezistentna 52 (86,7%) izolata. Visoka rezistencija na ampicilin (86,7%) je očekivana i sukladna rezultatima drugih studija (56).

Na amoksisilin s klavulanskom kiselinom su osjetljiva 44 (73,3%), umjereno rezistentna 12 (20%), a rezistentna 4 (6,7%) izolata. Svi rezistentni izolati pripadaju grupi *B. non-fragilis* [*B. thetaiotaomicron* (n=2), *B. ovatus* (n=1) i *B. distasonis* (n=1)].

Na piperacilin s tazobaktamom su osjetljiva 38 (63,3%), a umjereno rezistentna 22 (36,7%) izolata. Gotovo svi umjereno rezistentni izolati (20/22) pripadaju *B. non-fragilis* grupi, a polovicu tog broja (10/20) čini vrsta *B. thetaiotaomicron*. Rezistentnih izolata na piperacilin s tazobaktamom nema.

Na imipenem su osjetljiva 57 (95%), umjereno rezistentna 2 (3,3%), a rezistentan 1 (1,7%) izolat. Rezistentan izolat pripada vrsti *B. thetaiotaomicron*. Umjereno rezistentni su po jedan izolat *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*.

Na klindamicin su osjetljiva 8 (13,3%), a rezistentna 52 (86,7%) izolata. Visoka rezistencija na klindamicin je očekivana, iako ne u tolikoj mjeri.

Na moksifloksacin su osjetljiva 50 (83,3%), umjereno rezistentna 7 (11,7%), a rezistentna 3 (5%) izolata. Svi rezistentni izolati pripadaju vrsti *B. thetaiotaomicron*.

Na tigeciklin su osjetljiva 53 (88,3%), umjereno rezistentna 6 (10%), a rezistentan 1 (1,7%) izolat. Rezistentan izolat pripada vrsti *B. thetaiotaomicron*.

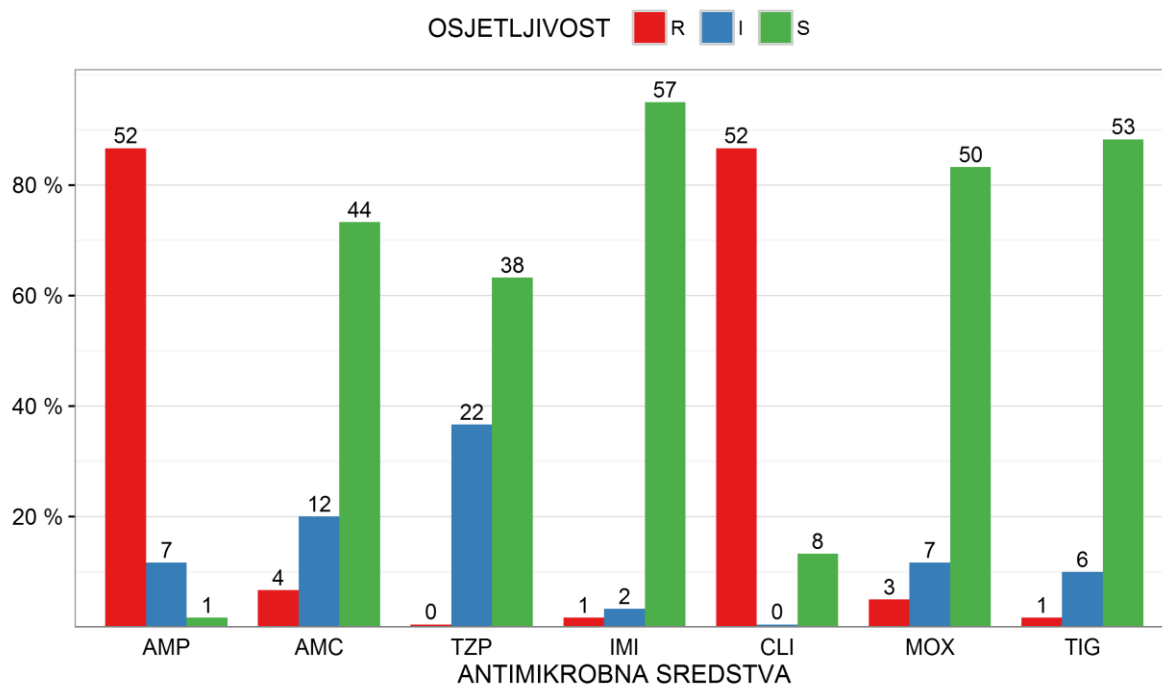
Tablica 5. Rezultat testiranja osjetljivosti na ostala antimikrobna sredstva izolata *B. fragilis* grupe

REZULTAT OSJETLJI- VOSTI	ANTIMIKROBNA SREDSTVA													
	AMP		AMC		TZP		IMI		CLI		MOX		TIG	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S	1	1,7	44	73,3	38	63,3	57	95,0	8	13,3	50	83,3	53	88,3
I	7	11,7	12	20,0	22	36,7	2	3,3	0	0,0	7	11,7	6	10,0
R	52	86,7	4	6,7	0	0,0	1	1,7	52	86,7	3	5,0	1	1,7

Apsolutan broj (N) i % izolata koji su S/I/R na antimikrobna sredstva.

Ampicilin (AMP), amoksicilin i klavulanska kiselina (AMC), piperacilin i tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), klindamicin (CLI), moksifloksacin (MOX) i tigeciklin (TGC).

S = osjetljivo, I = umjereno rezistentno, R = rezistentno.



Dijagram 1. Rezultat testiranja osjetljivosti na ostala antimikrobna sredstva izolata *B. fragilis* grupe

Ampicilin (AMP), amoksicilin i klavulanska kiselina (AMC), piperacilin i tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), klindamicin (CLI), moksifloksacin (MOX) i tigeciklin (TGC).

S = osjetljivo, I = umjereno rezistentno, R = rezistentno.

5.2. Ostali geni rezistencije

Rezultati probira na ostale gene rezistencije sojeva *B. fragilis* grupe prikazani su u Tablicama 3.-4. i 6.-7., te Dijagramu 2.

cepA gen je detektiran u 27 (45%) izolata [*B. fragilis* (n=21), *B. ovatus* (n=4) i *B. thetaiotaomicron* (n=2)]. U svim izolatima s *cepA* genom je zabilježena fenotipska rezistencija na ampicilin, osim u slučaju jednog izolata (*B. ovatus*), koji je osjetljiv na ampicilin.

cfiA gen je detektiran u jednom (1,7%) izolatu (*B. fragilis*), koji je umjereno rezistentan na imipenem. Isti izolat je ujedno *tetQ* gen pozitivan, ali *cepA* gen negativan.

ermF gen je detektiran u 20 (33,3%) izolata [*B. fragilis* (n=4) i *B. non-fragilis* (n=16)]. U svim izolatima s *ermF* genom je zabilježena fenotipska rezistencija na klindamicin, osim u slučaju jednog izolata (*B. vulgatus*), koji je osjetljiv na klindamicin.

tetQ gen je detektiran u 52 (86,7%) izolata [*B. fragilis* (n=18) i *B. non-fragilis* (n=34)]. U samo jednom izolatu s *tetQ* genom je zabilježena fenotipska rezistencija na tigeciklin, a pripada vrsti *B. thetaiotaomicron*.

Također je uspoređena zastupljenost gena rezistencije (*cepA*, *cfiA*, *ermF* i *tetQ*) između podgrupa *B. fragilis* i *B. non-fragilis*. (Tablica 7.).

U fokusu je bila usporedba proporcija (relativnih frekvencija) s kojima se pojedini gen pojavljuje u dvjema navedenim podgrupama izolata. Osim deskriptivne usporedbe zastupljenosti gena i odgovarajućih frekvencija, od interesa je bila i inferencijalna analiza razlika u proporcijama. Takva formalna analiza omogućuje generalizaciju zaključaka izvedenih iz uzorka na opću populaciju. Pitanje na koje ova inferencijalna analiza treba dati odgovor je: postoji li statistički značajna razlika u zastupljenosti promatranog gena između podgrupa *B. fragilis* i *B. non-fragilis*?

Uz veličine uzoraka (22 i 38), statistička analiza usporedbe proporcija provedena je neparametrijskim testovima. Testiranje razlika između dviju proporcija analogno je

testiranju nezavisnosti u 2x2 tablici kontingencije, na način da se u ćelijama postave frekvencije pojavljivanja i nepojavljivanja dotičnog gena, i to za svaku grupu izolata. Primarni korišteni test je Pearsonov hi – kvadrat test (X^2) o nezavisnosti dviju kategorijskih varijabli. U slučajevima gdje su očekivane frekvencije pojavljivanja/nepojavljivanja gena jako male (< 5), Pearsonov hi – kvadrat test može biti nepouzdan. U takvim slučajevima koristio se dvostrani Fisherov egzaktni test, kod kojeg se dobivaju egzaktne p – vrijednosti bez obzira na to da li su očekivane frekvencije jako male, ili čak 0 (nula). Razina značajnosti postavljena je na $p = 0.05$ za sve testove.

Razlika u zastupljenosti gena *cepA* testirana je hi – kvadrat testom koji je pokazao da je *cepA* statistički značajno više zastupljen kod *B. fragilis* nego kod *B. non-fragilis*, $X^2(1, N = 60) = 35.73, p < 0.001$.

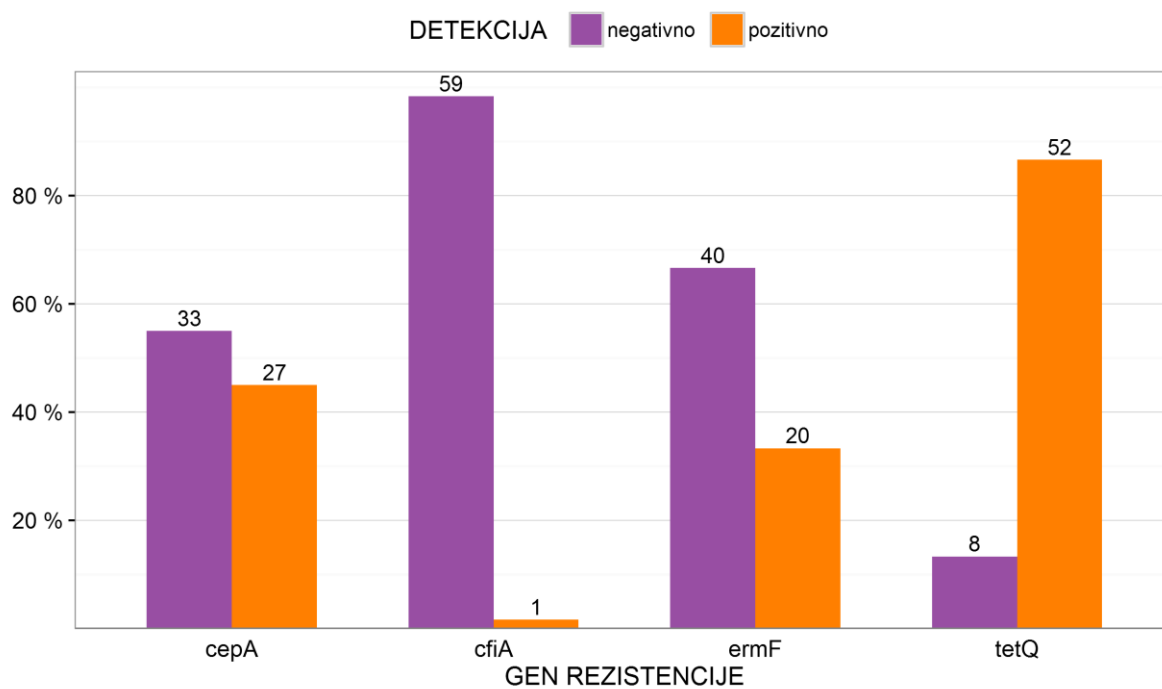
Kod *cfiA* gena pomoću Fisherovog egzaktnog testa nije pronađena statistički značajna razlika u zastupljenosti, $p = 0.37$.

Razlika u zastupljenosti gena *ermF* je na granici statističke značajnosti, a testirana je hi – kvadrat testom, $X^2(1, N = 60) = 3.59, p = 0.058$. Za očekivati je da bi nešto veći uzorak donio i statistički značajan rezultat, sa zaključkom da je *ermF* gen zastupljeniji kod *B. non-fragilis* u odnosu na *B. fragilis*.

Zbog male očekivane frekvencije u jednoj ćeliji, razlika u zastupljenosti za gen *tetQ* testirana je Fisherovim egzaktnim testom, te nije pronađena statistički značajna razlika između grupa izolata, $p = 0.45$.

Tablica 6. Rezultat probira na ostale gene rezistencije izolata *B. fragilis* grupe

	OSTALI GENI REZISTENCIJE							
	<i>cepA</i>		<i>cfiA</i>		<i>ermF</i>		<i>tetQ</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
pozitivno	27	45,0	1	1,7	20	33,3	52	86,7
negativno	33	55,0	59	98,3	40	66,7	8	13,3



Dijagram 2. Rezultat probira na ostale gene rezistencije izolata *B. fragilis* grupe

cepA, *cfiA*, *ermF*, *tetQ* - geni rezistencije.

Tablica 7. Distribucija ostalih gena rezistencije između *B. fragilis* i *B. non-fragilis* izolata i povezanost gena s izolatima rezistentnim na ampicilin, imipenem, klindamicin i tigeciklin

Bacteroides izolati	Broj izolata s genom rezistencije (%)				
	<i>cepA</i>	<i>cfiA</i>	<i>ermF</i>	<i>tetQ</i>	
<i>B. fragilis</i> (n=22)	21 (95,5)	1 (4,5)	4 (18,2)	18 (81,8)	
<i>B. non-fragilis</i> (n=38)	6 (15,8)	0 (0,0)	16 (42,1)	34 (89,5)	
Broj rezistentnih Bacteroides izolata	Antibiotik	Broj rezistentnih izolata s genom rezistencije (%)			
		<i>cepA</i>	<i>cfiA</i>	<i>ermF</i>	<i>tetQ</i>
<i>B. fragilis</i> (n=21)	AMP	21 (100,0)	–	–	–
<i>B. non-fragilis</i> (n=31)	AMP	5 (16,1)	–	–	
<i>B. fragilis</i> (n=0)	IMI	–	0 (0,0)	–	
<i>B. non-fragilis</i> (n=1)	IMI	–	0 (0,0)	–	
<i>B. fragilis</i> (n=19)	CLI	–	–	4 (21,1)	
<i>B. non-fragilis</i> (n=33)	CLI	–	–	15 (45,5)	
<i>B. fragilis</i> (n=0)	TIG	–	–	–	0 (0,0)
<i>B. non-fragilis</i> (n=1)	TIG	–	–	–	1 (100,0)

Ampicilin (AMP), imipenem (IMI), klindamicin (CLI), tigeciklin (TGC).

cepA, *cfiA*, *ermF*, *tetQ* - geni rezistencije.

5.3. Indukcija rezistencije

Rezistencija na metronidazol je inducirana u 12 (23,1%) od 52 nasumično odabranih izolata, nakon 9-17 supkultivacija na podlozi s metronidazolom.

Vrijednost MIK-a metronidazola u induciranim sojevima je bila u rasponu 8-96 mg/L, što iznosi povećanje 4-96 x u odnosu na vrijednost MIK-a u originalnim sojevima (Tablica 8.).

Nastala rezistencija na metronidazol je stabilna, jer su inducirani sojevi zadržali rezistenciju i nakon tri supkultivacije na Brucella krvnom agaru bez antibiotika.

Tablica 8. Karakteristike sojeva *Bacteroides* spp. sa stečenom inducibilnom rezistencijom na metronidazol i MIK metronidazola u originalnim i induciranim sojevima

Oznaka soja	Vrsta uzorka	Vrsta <i>Bacteroides</i> spp.	nim (A-E)	MIK MET (mg/L)		Porast MIK-a MET (xMIK)
				Originalni sojevi	Inducirani sojevi	
BF 92	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	1	96	96
BF 103	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	1	24	24
BF 119	Intraoperativna tekućina	<i>B. fragilis</i>	–	1	96	96
BT 88	Apsces	<i>B. thetaiota-omicron</i>	–	4	16	4
BF 143	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	1	24	24
BF 191	Intraoperativna tekućina	<i>B. fragilis</i>	–	1	16	16
BF 113	Intraoperativna tekućina	<i>B. fragilis</i>	–	1	16	16
BF 124	Intraoperativna tekućina	<i>B. fragilis</i>	–	1	64	64
BF 182	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	1	8	8
BF 183	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	2	16	8
BF 184	Aspiracijska tekućina	<i>B. fragilis</i>	–	4	16	4
BF 190	Rana	<i>B. fragilis</i>	–	1	64	64

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija. nim (A-E) – gen rezistencije.

5.4. Laktat dehidrogenaza

U Tablici 9. prikazane su vrijednosti aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u originalnim i sojevima s induciranom rezistencijom na metronidazol unutar *B. fragilis* grupe, te ovisnost sojeva o metronidazolu, koji je inkorporiran u hranjivu podlogu.

Usporedbom vrijednosti aktivnosti LDH između induciranih (MTZ 16) i neinduciranih sojeva (MTZ 0), uočavaju se značajno niže vrijednosti enzima sojeva s induciranom rezistencijom na metronidazol (Wilcoxonov neparametrijski test za uparene uzorke, p vrijednost 0.099). U samo jednom soju (BF 124) s induciranom rezistencijom na metronidazol izmjerena je značajno viša vrijednost aktivnosti LDH.

I u slučaju sumnje na realističnost ove izdvojene vrijednosti i izbacivanja cijelog retka za BF124, provedbom t - testa za uparene uzorke (distribucija razlika približno normalna) pokazalo bi se također da su vrijednosti LDH značajno niže kod induciranih sojeva pri izloženosti 16 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 20.56$, $SD = 12.59$) nego kod neinduciranih sojeva pri izloženosti 0 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 32.86$, $SD = 10.60$), $t(10) = 3.23$, $p = 0.009$.

Razlika u aktivnosti LDH s obzirom na izloženost metronidazolu (0 $\mu\text{g/mL}$ i 0.125 $\mu\text{g/mL}$) kod neinduciranih sojeva testirana je t – testom za uparene uzorke, te se pokazalo da su vrijednosti LDH statistički značajno niže pri izloženosti 0.125 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 23.20$, $SD = 9.18$) nego pri 0 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 34.68$, $SD = 10.72$), $t(3) = 3.20$, $p = 0.049$.

Kod induciranih sojeva, razlika u aktivnosti LDH s obzirom na izloženost metronidazolu (0 $\mu\text{g/mL}$ i 16 $\mu\text{g/mL}$) također je testirana t – testom za uparene uzorke, te nije pokazana statistički značajna razlika između izloženosti 16 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 14.84$, $SD = 3.98$) nego pri 0 $\mu\text{g/mL}$ ($M = 15.36$, $SD = 5.17$), $t(4) = 0.32$, $p = 0.765$.

Oba testa provedena su nad malim uzorcima, veličine 4 i 5, no grafičkom inspekcijom utvrđeno je da su vrijednosti razlika približno normalno distribuirane što opravdava korištenje t – testa za uparene uzorke.

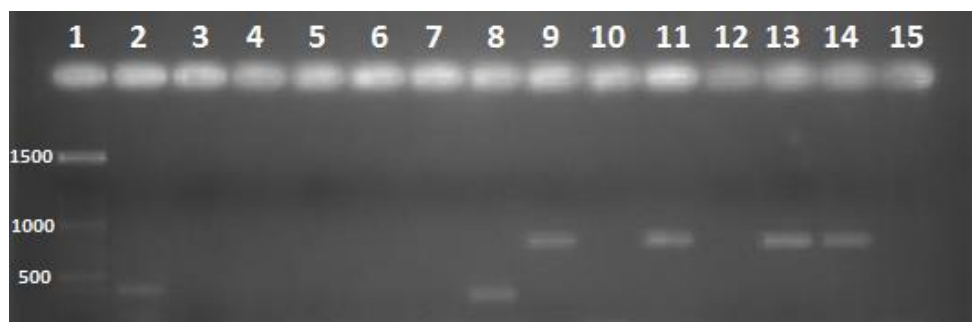
Tablica 9. Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u originalnim i sojevima *Bacteroides* spp. s induciranom rezistencijom na metronidazol

Oznaka soja	Inducirani sojevi				Neinducirani sojevi			
	MTZ 16 µg/mL	S.D.	MTZ 0 µg/mL	S.D.	MTZ 0,125 µg/mL	S.D.	MTZ 0 µg/mL	S.D.
	Srednja vrijednost LDH aktivnosti (U/mg)		Srednja vrijednost LDH aktivnosti (U/mg)		Srednja vrijednost LDH aktivnosti (U/mg)		Srednja vrijednost LDH aktivnosti (U/mg)	
BF 92	22,4	1,8	–	–	–	–	34,3	3,5
BF 103	25,4	1	–	–	–	–	15,7	0,7
BF 119	14,4	0,3	19,9	1,5	27	1,6	30	2,3
BT 88	8,7	1,7	6,8	0	14,3	0	23,3	0,1
BF 143	17,5	2,5	18,9	0,3	17,2	0,6	37	1,2
BF 191	19,1	0	15,1	0,8	34,3	0,3	48,4	3
BF 113	14,5	0,7	16,1	2,1	–	–	43	4,8
BF 124	222	6,5	–	–	–	–	49,1	3,5
BF 182	54,1	1,5	–	–	–	–	49	2
BF 183	26,7	0	–	–	–	–	26,3	1,2
BF 184	14,2	0,8	–	–	–	–	27,5	1,3
BF 190	9,2	1,6	–	–	–	–	27	2,7
NCTC 9343	–	–	–	–	–	–	34,5	0,7

S.D. - standardna devijacija

5.5. Gel elektroforeza produkta umnožavanja

Slikovni prikazi gel elektroforeze s produktima umnožavanja gena rezistencije (*cepA*, *cfiA*, *ermF*, *tetQ*) prikazani su na Slikama 6.-9.



Slika 6. Gel elektroforeza produkta umnožavanja *cepA* gena

Linije 1-15:

Linija 1 - molekularni marker (fragmenti veličine po 100 bp, u rasponu 100-1500 bp);

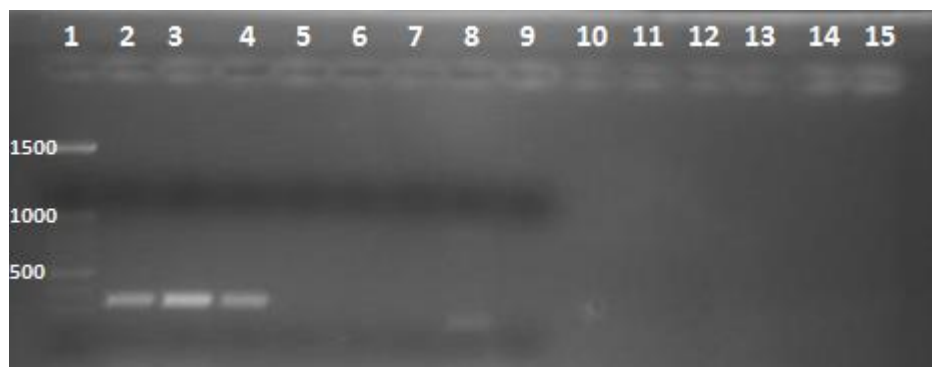
linije 2, 8 - nespecifični amplifikat (400 bp);

linije 3-7 - negativni izolati;

linije 9, 11, 13 - pozitivni izolati (produkt 780 bp);

linija 14 - pozitivna kontrola *cepA* poz. izolat iz rutine;

linija 15 - negativna kontrola *B. fragilis* ATCC 25285.



Slika 7. Gel elektroforeza produkta umnožavanja *cfiA* gena

Linije 1-15:

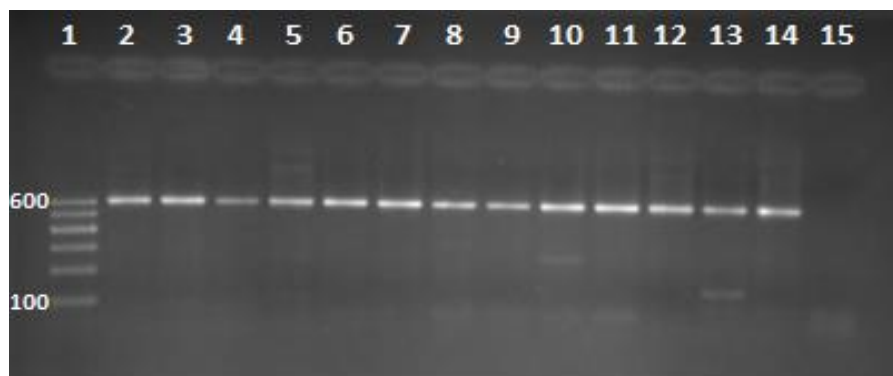
Linija 1 - molekularni marker (fragmenti veličine po 100 bp, u rasponu 100-1500 bp);

linija 2 - pozitivna kontrola *cfiA* poz. izolat iz rutine (produkt ~350 bp);

linije 3-4 - pozitivan izolat u duplikatu (produkt ~350 bp);

linije 5-14 - negativni izolati;

linija 15 - negativna kontrola *B. fragilis* ATCC 25285.



Slika 8. Gel elektroforeza produkta umnožavanja *tetQ* gena

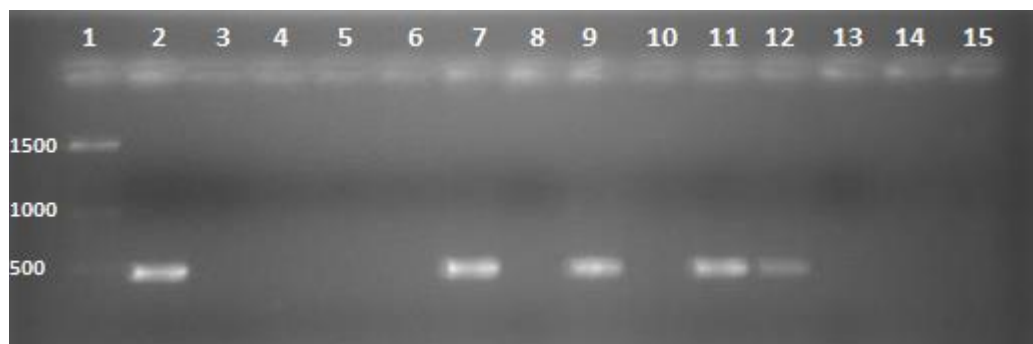
Linije 1-15:

Linija 1 - molekularni marker (fragmenti veličine po 100 bp, u rasponu 100-600);

linija 2 - pozitivna kontrola *B. fragilis* BF-8 (produkt ~600 bp);

linije 3-14 - pozitivni izolati (produkt ~600 bp);

linija 15 - negativna kontrola *B. fragilis* ATCC 25285.



Slika 9. Gel elektroforeza produkta umnožavanja *ermF* gena

Linije 1-15:

Linija 1 - molekularni marker (fragmenti veličine po 100 bp, u rasponu 100-1500 bp);

linija 2 - pozitivna kontrola *B. fragilis* BF-8 (produkt ~500 bp);

linije 3-6, 8, 10, 13-14 - negativni izolati;

linije 7, 9, 11-12 - pozitivni izolati (produkt ~500 bp);

linija 15 - negativna kontrola *B. fragilis* ATCC 25285.

6. RASPRAVA

Anaerobne bakterije su vrlo raširene u prirodi. Nalazimo ih u tlu, te na koži i sluznicama čovjeka i životinja. Vrste roda *Bacteroides* su oportunistički patogeni, koje nalazimo uglavnom u miješanim infekcijama zajedno s drugim anaerobnim ili fakultativno anaerobnim bakterijama. *B. fragilis* uzrokuje gotovo 2/3 intraabdominalnih apscesa i najznačajniji je uzročnik bakterijemije među svim anaerobnim bakterijama (8, 14, 71).

Izolacija anaerobnih bakterija i identifikacija istih do razine vrste, te ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je zahtjevan i dugotrajan postupak, stoga se u mnogim mikrobiološkim laboratorijima provodi tek ograničena dijagnostika anaerobnih bakterija, koja ne obuhvaća testiranje antimikrobne osjetljivosti (80). Testiranje antimikrobne osjetljivosti opterećeno je naime tehničkim poteškoćama vezanim za samu metodu, zahtjevnom i dugotrajnom dijagnostikom anaerobnih bakterija, te uvođenjem empirijske terapije puno ranije od dobivanja rezultata testiranja antimikrobne osjetljivosti (24).

Antimikrobna osjetljivost anaerobnih bakterija nije više stabilna niti predvidljiva. Rezistencija anaerobnih bakterija, osobito *B. fragilis* grupe, na antimikrobna sredstva je u porastu u mnogim dijelovima svijeta, uključujući rezistenciju i na najučinkovitija antimikrobna sredstva koja se koriste u liječenju anaerobnih infekcija, kao što su karbapenemi i 5-nitroimidazoli (80). Jedan od antibiotika iz skupine 5-nitroimidazola je i metronidazol, koji je lijek izbora u liječenju anaerobnih infekcija (16).

Vjerojatni mehanizam djelovanja metronidazola uključuje pasivnu difuziju lijeka u bakterijsku stanicu i intracelularnu aktivaciju njegove nitro skupine procesom redukcije, pri čemu nastaju slobodni radikali s citotoksičnom aktivnosti prema deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) bakterijske stanice (41).

Rezistencija na metronidazol opisana je na području Europe (12, 24, 49, 81-84), Sjeverne (30, 85) i Južne (86) Amerike, te Azije (28, 87). Opisuju se čak i multirezistentni sojevi *B. fragilis* (*B. fragilis* MDR; engl. *multidrug-resistant*) koji su istovremeno rezistentni na antibiotike iz različitih skupina antibiotika (88-91).

Najviše istraživani mehanizam rezistencije na metronidazol unutar *Bacteroides* spp. je enzim 5-nitroimidazol reduktaza, koji je produkt *nim* gena. 5-nitroimidazol

reduktaza pretvara metronidazol u aminoderivat, koji je netoksičan za DNK bakterijske stanice (55).

Iz navedenoga slijedi nužnost barem povremenog testiranja antimikrobne osjetljivosti većeg broja sojeva u svrhu praćenja trendova osjetljivosti i rezistencije na nacionalnoj i lokalnim razinama. Praćenje trendova osjetljivosti i rezistencije pomaže kliničarima u odabiru empirijske antimikrobne terapije. Moguća primjena neodgovarajuće terapije ima za posljedicu dulju hospitalizaciju i veću smrtnost bolesnika (22, 24, 31-32).

No, u slučajevima teških anaerobnih infekcija i stanja, kao što su bakterijemija, infekcija središnjeg živčanog sustava, izolacija čiste kulture, izostanak pozitivnog odgovora na postojeću terapiju ili pak infekcije koja zahtijeva dugotrajnu terapiju, npr. apscesa mozga, endokarditisa, osteomijelitisa, infekcije zglobova i endoproteza, refrakterne i rekurentne bakterijemije, potrebno je uz točnu identifikaciju svakako odrediti i osjetljivost izoliranog soja na antimikrobna sredstva (2, 12, 92).

Po mogućnosti vrši se i probir izoliranih sojeva na gene rezistencije (18, 28) ili njihove produkte (29).

Upravo radi praćenja trendova osjetljivosti i rezistencije, radna skupina za anaerobne infekcije pri Europskom društvu za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESGAI) (56), ispitala je tijekom razdoblja siječanj 2008. – ožujak 2009. antimikrobnu osjetljivost 824 soja *Bacteroides* spp. iz 13 europskih zemalja, razvrstanih u četiri skupine zemalja (skandinavski, zapadnoeuropski-kontinentalni, mediteranski i istočni) na devet antibiotika (ampicilin, amoksicilin s klavulanskom kiselinom, piperacilin s tazobaktamom, cefoksitin, imipenem, klindamicin, tigeciklin, moksifloksacin i metronidazol). Hrvatska, koja je također sudjelovala u navedenoj studiji, uvrštena je u skupinu istočnih zemalja.

Prema izvješću ove radne skupine, rezistencija *Bacteroides* spp. na ampicilin je u rasponu od 94,2% (zapadnoeuropska-kontinentalna skupina) do 100% (skandinavski skupina); amoksicilin s klavulanskom kiselinom od 8,8% (skandinavski skupina) do 12,4% (mediteranski skupina); piperacilin s tazobaktamom od 8,1% (istočni skupina) do 16,5% (skandinavski skupina); cefoksitin od 13,5% (zapadnoeuropska-kontinentalna skupina) do 25,8% (skandinavski skupina); imipenem od 0,4% (istočni skupina) do 1,6% (mediteranski skupina); klindamicin od 22,5% (skandinavski skupina) do 41,9% (mediteranski skupina); tigeciklin od 0,6%

(skandinavski skupina) do 2,4% (zapadnoeuropska-kontinentalna skupina); moksifloksacin od 5,4% (mediteranska skupina) do 21,4% (skandinavski skupina), te metronidazol od 0,6% (skandinavski skupina) do 0,8% (istočna skupina).

Hrvatska je sudjelovala s 56 sojeva *Bacteroides* spp. i zabilježila 98,2% rezistentnih sojeva na ampicilin; 8,8% rezistentnih sojeva na amoksisilin s klavulanskom kiselinom; 3,5% rezistentnih sojeva na piperacilin s tazobaktamom; 5,3% rezistentnih sojeva na cefoksitin; 44,6% rezistentnih sojeva na klindamicin; 7% rezistentnih sojeva na moksifloksacin, te 1,8% rezistentnih sojeva na metronidazol. Nisu zabilježeni rezistentni sojevi *Bacteroides* spp. na imipenemu niti tigeciklinu.

U izvješću Akademije medicinskih znanosti Hrvatske o osjetljivosti i rezistenciji bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2014. (93) prikazani su rezultati testiranja na penicilin, amoksisilin s klavulanskom kiselinom, piperacilin s tazobaktamom, ertapenem, klindamicin i metronidazol posebno za skupinu gram-negativnih, odnosno gram-pozitivnih anaerobnih bakterija.

Prema navedenom izvješću, za cijelu skupinu gram-negativnih anaerobnih bakterija izražena je visoka rezistencija na penicilin (74%) i klindamicin (25%), dok su izolati rezistentni na ko-amoksiklav, piperacilin s tazobaktamom i ertapenem rijetki. Rezistencija na metronidazol iznosila je 17%.

U našoj studiji testirana je antimikrobna osjetljivost samo za *Bacteroides* spp. Pritom je u vezi određenih antimikrobnih sredstava osim određivanja MIK-ova, učinjen i probir na gene rezistencije.

Prema našim rezultatima, zabilježen je također velik broj rezistentnih izolata na ampicilin i klindamicin. Visoka rezistencija na ampicilin (86,7%) je očekivana i sukladna rezultatima drugih studija (56). Pritom je rezistencija na ampicilin unutar podgrupe *B. non-fragilis* veća u odnosu na podgrupu *B. fragilis* (59,6% vs 40,4%), no, samo 16,1% izolata u podgrupi *B. non-fragilis* koji su rezistentni na ampicilin imaju *cepA* gen, dok svi izolati u podgrupi *B. fragilis* koji su rezistentni na ampicilin imaju *cepA* gen (Tablice 3-7).

Ostali mehanizmi koji bi mogli biti odgovorni za fenotipsku rezistenciju na ampicilin su npr. promjena PBP-a ili takozvani efluks (59).

Selekcioniranje visoke rezistencije na klindamicin (86,7%) moguće je posljedica antibiotskog selektivnog pritiska, jer se klindamicin u kombinaciji s ciprofloksacinom

vrlo često primjenjuje u liječenju infekcija rana. I neke druge studije opisuju trend porasta rezistencije na klindamicin (81), uz preporuku izbjegavanja istog u empirijskoj terapiji anaerobnih infekcija. Pritom je rezistencija i na klindamicin veća unutar podgrupe *B. non-fragilis* u odnosu na podgrupu *B. fragilis* (63,5% vs 36,5%), a podgrupa *B. non-fragilis* sadrži i veći postotak rezistentnih izolata s *ermF* genom, u odnosu na podgrupu *B. fragilis* (45,5% vs 21,1%) (Tablice 3-7).

Izolati rezistentni na amoksicilin s klavulanskom kiselinom, imipenem, tigeciklin i moksifloksacin su rijetki (Tablice 3-7). Svi izolati rezistentni na imipenem, tigeciklin i moksifloksacin, te većina izolata rezistentna na amoksicilin s klavulanskom kiselinom pripadaju vrsti *B. thetaiotaomicron* (Tablice 3-4).

Detektiran je samo jedan *cfiA* gen i to u izolatu *B. fragilis*, koji je umjereno rezistentan na imipenem. Ovaj nalaz je sukladan podacima iz literature, jer ne postoji *B. non-fragilis* izolat s *cfiA* genom, a rijetki su i sojevi *B. fragilis* s *cfiA* genom koji su fenotipski rezistentni na imipenem (71, 94-95).

Detekcija *tetQ* gena u podgrupi *B. fragilis* iznosi (81,8%), a u podgrupi *B. non-fragilis* (89,5%) ali je rezistencija na tigeciklin zabilježena samo u jednom izolatu *B. thetaiotaomicron*.

Nisu zabilježeni izolati rezistentni na piperacilin s tazobaktamom, no 36,7% izolata je umjereno rezistentno na piperacilin s tazobaktamom i gotovo polovina ovih izolata također pripada vrsti *B. thetaiotaomicron*.

Iz navedenoga proizlazi da je upravo *B. thetaiotaomicron* najrezistentnija vrsta, dok je *B. fragilis* najčešće izolirana vrsta iz uzoraka kliničkog materijala.

Svi ispitivani sojevi *Bacteroides* spp. su osjetljivi na metronidazol (MIK ≤ 4 mg/L) i niti u jednom izolatu nije detektiran *nim* (A-E) gen rezistencije. Budući da nema *nim* gena, nije moguća ni tipizacija istih RFLP metodom uz enzim restrikcijska endonukleaza, niti potvrda hipoteze o *nimA* genu, kao najčešćem tipu *nim* gena.

Izostanak fenotipske rezistencije na metronidazol i *nim* gena rezistencije u zbirci sa 161 izolatom iz *B. fragilis* grupe zabilježen je također i u studiji Eitel i sur. (71), a Sóki, koji je detektirao *nim* gen u svega 3 od 640 (0,5%) izolata iz *B. fragilis* grupe, ističe promijenjenu učestalost *nim* gena u Europi (55).

Posve suprotno ovim europskim studijama, brazilska studija Nakana i sur. (20) opisuje *nim* gen u 7,8% izolata iz *B. fragilis* grupe od ukupno 114 izolata iz mikrobiote crijeva u djece, što govori o različitoj geografskoj distribuciji *nim* gena.

Međutim, u nekim ranijim europskim studijama *nim* gen je detektiran u 50 od 206 (24%) (14), odnosno 30 od 1502 (2%) izolata *B. fragilis* grupe (26).

U obje ove studije postignuta je *in vitro* indukcija rezistencije na metronidazol samo u sojevima s *nim* genom i samo neki od tih induciranih sojeva su zadržali stabilnu rezistenciju na metronidazol nakon tri uzastopna presađivanja na podlozi bez metronidazola.

I dok je MIK metronidazola u sojevima bez *nim* gena bio u rasponu 0,25 - 2 mg/L, originalni MIK metronidazola, prije induciranja rezistencije, u sojevima s *nim* genom nalazio se u rasponu 1,5 - >256 mg/L (14), što znači da je *nim* gen bio prisutan kako u fenotipski rezistentnim, tako i u fenotipski osjetljivim sojevima na metronidazol.

Detekcija rezistentnih sojeva ne smije se stoga temeljiti isključivo na detekciji gena rezistencije, već mora svakako obuhvatiti i testiranje antimikrobne osjetljivosti, tj. određivanje vrijednosti MIK-a metronidazola.

U jednom *nim*-pozitivnom soju s visokom rezistencijom na metronidazol (MIK 64 mg/L), te u dva *nim*-pozitivna soja s induciranom rezistencijom na metronidazol (MIK $\geq$ 256 mg/L) nije detektirana niti jedna od poznatih insercijskih sekvencija (IS), pa se postavlja pitanje postojanja neke nove IS, drugog načina aktivacije *nim* gena ili nekog drugog mehanizma rezistencije, odnosno općenito se propituje uloga IS u ekspresiji *nim* gena (26).

Osim ovih *nim*-pozitivnih sojeva s fenotipskom rezistencijom na metronidazol, postoje također i oni fenotipski rezistentni sojevi na metronidazol bez *nim* gen (14).

Suprotno dvjema gore navedenim studijama, u našoj je studiji postignuta indukcija rezistencije na metronidazol u sojevima *B. fragilis* grupe bez *nim* gena, nakon višekratnog izlaganja sojeva subinhibitornim koncentracijama metronidazola u podlozi. Vrijednost MIK-a metronidazola u induciranim sojevima nalazila se u rasponu 8 - 96 mg/L, što iznosi povećanje 4 - 96 x u odnosu na vrijednost MIK-a u originalnim sojevima. Svi inducirani sojevi zadržali su stabilnu rezistenciju nakon tri presađivanja na podlozi bez metronidazola.

Mogućnost indukcije rezistencije u sojevima bez *nim* gena, uz najvišu vrijednosti MIK-a metronidazola 96 mg/L i stabilnost rezistencije, ne potvrđuje ni hipotezu o indukciji rezistencije u sojevima s *nim* genom i vrijednosti MIK-a metronidazola ≥ 256 mg/L.

In vitro indukcija rezistencije na metronidazol u sojevima *B. fragilis* grupe bez *nim* gena opisana je također u studiji R. Schaumanna (27), koja međutim istovremeno opisuje i indukciju rezistencije u sojevima s *nim* genom.

I liječenje metronidazolom može selekcionirati *nim* pozitivnu subpopulaciju koja je rezistentna na metronidazol, što uz mogući prijenos *nim* gena na druge anaerobne (npr. *Prevotella* spp., gram-pozitivni anaerobni koki) i fakultativno anarobne bakterije, čini *B. fragilis* grupu značajnim izvorom rezistencije na metronidazol u debelom crijevu čovjeka (26).

Opis prvog izolata *B. fragilis* s izraženom rezistencijom na metronidazol potječe iz 1978. Soj je izoliran u bolesnika oboljelog od Chronove bolesti, koji je bio na dugotrajnoj terapiji metronidazolom (11). Dok je dotični soj bio visoko rezistentan na metronidazol (MIK 64 mg/L) i rezistenciju nije bilo moguće prenijeti konjugacijom na osjetljive sojeve, sredinom 80.-tih godina prošlog stoljeća pojavili su se izolati s umjerenom rezistencijom na metronidazol, koja se obično uspješno prenosila konjugacijom na osjetljive sojeve. Ovi potonji izolati imali su MIK metronidazola oko tzv. *breakpoint* vrijednosti između osjetljivosti i rezistencije, a MIK-ovi ostalih 5-nitroimidazola, npr. tinidazola ili ornidazola bili su viši od MIK-a metronidazola (41).

Pretpostavlja se da je fenotip prvog izolata *B. fragilis* s visokom rezistencijom na metronidazol vjerojatno posljedica kromosomske mutacije onih gena, koji su uključeni u proces redukcije lijeka i posljedično ulaska lijeka u bakterijsku stanicu, a izolata s umjerenom rezistencijom na metronidazol posljedica djelovanja produkta *nim* gena rezistencije (41).

Indukcija rezistencije na metronidazol u sojevima bez *nim* gena upućuje na postojanje drugih mehanizama rezistencije ili ukazuje na činjenicu da postojeće početnice za detekciju *nim* gena ipak nisu toliko univerzalne kako bi detektirale baš svaki tip *nim* gena. Tako se među ostalim mehanizmima odgovornim za nastanak rezistencije ističu oslabljena enzimatska aktivnost piruvat:feredoksin oksidoreduktaze,

smanjenje flavodoksina, porast laktat dehidrogenaze (48), odnosno povećanje enzimatske aktivnosti laktat dehidrogenaze tijekom regulacije fizioloških procesa u sojevima rezistentnim na metronidazol (96). Studija Davida Leitcha (97) propituje izravan učinak produkta *nim* gena u inaktivaciji metronidazola, jer ista nije dokazala korelaciju između razine *nim* gena i razine rezistencije na metronidazol u induciranim sojevima.

U našoj studiji (98) je uspjela *in vitro* indukcija rezistencije na metronidazol u sojevima koji nisu bili nosioci *nim* gena rezistencije, pa je ispitivana aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH), čija povišena aktivnost može biti povezana s jednim drugim mehanizmom rezistencije, koji isključuje intracelularnu aktivaciju metronidazola.

LDH je oksidoreduktazni enzim, koji katalizira reverzibilnu reakciju pretvorbe piruvata u laktat, a piruvat:feredoksin oksidoreduktaza (PFOR), koji sudjeluje u pretvorbi piruvata u acetat, upravo onaj enzim koji ima važnu ulogu u intracelularnoj aktivaciji lijeka i osjetljivosti na metronidazol (Slika 3.).

U slučaju smanjene aktivnosti ili gubitka PFOR kompleksa izostaje redukcija metronidazola i nastaje drugi put pretvorbe piruvata u laktat, uz povišenu aktivnost LDH. Povišena aktivnost LDH tako kompenzira smanjenu aktivnost PFOR kompleksa u sojevima s visokim MIK-om metronidazola (43, 46, 48, 99).

I dok Narikawa (96) ističe da već 2 mg/L metronidazola u reakcijskoj smjesi inhibira oksidoreduktaznu aktivnost PFOR kompleksa soja *B. fragilis* NCTC 11295 s induciranom rezistencijom na metronidazol, jedna druga grupa autora (100) nalazi da je aktivnost ovoga enzima u soju *B. fragilis* NCTC 11295 komparabilna s vrijednošću enzima osjetljivih sojeva i zaključuje da rezistencija na metronidazol nije povezana sa smanjenom aktivnošću PFOR kompleksa, već nekim drugim mehanizmom.

U našoj je studiji (98) samo jednom soju *B. fragilis* (BF 124) s induciranom rezistencijom na metronidazol izmjeren značajan porast aktivnosti LDH, dok je u većine ostalih induciranih sojeva izmjeren pad aktivnosti LDH u odnosu na neinducirane sojeve.

Pad aktivnosti LDH je u suprotnosti s rezultatima dosadašnjih studija, gdje se uz povišeni MIK metronidazola bilježi porast aktivnosti LDH. Porast aktivnosti LDH može biti kompenzacija smanjene aktivnosti PFOR kompleksa, no može nastati vjerojatno i samostalno, neovisno o aktivnosti PFOR kompleksa.

Nalaz značajno niže aktivnosti LDH u sojevima s induciranom rezistencijom na metronidazol mogao bi biti povezan sa smanjenim sadržajem proteina uslijed smanjene ekspresije gena (engl. *down regulated*), u okviru globalne negativne regulacije fizioloških procesa u bakterijskoj stanici tijekom izlaganja metronidazolu (48, 96).

Nalaz značajno povišene aktivnosti LDH u soju *B. fragilis* (BF 124) mogao bi biti posljedica ne toliko fiziološkog zbivanja, koliko određene genetske mutacije (48, 101-102).

Ova zapažanja o promjeni aktivnosti LDH u sojevima s induciranim rezistencijom na metronidazol zahtijevaju ispitivanje i ostalih enzima, prvenstveno piruvat:feredoksin oksidoreduktaze, koji nalaze svoje mjesto kako u procesu redukcije metronidazola, tako i u procesu indukcije rezistencije na metronidazol.

Rezultati ove studije donose tek početne spoznaje o mehanizmima rezistencije u procesu indukcije rezistencije na metronidazol u *B. fragilis* grupi bez *nim* gena i zahtijevaju dodatni napor u proučavanju istih nakon *in vitro* izlaganja sojeva antibiotiku.

7. ZAKLJUČCI

- U *B. fragilis* grupi nema rezistentnih izolata na metronidazol, niti izolata s genom rezistencije *nim* (A-E).
- Budući da gen *nim* (A-E) nije detektiran, nije moguća ni tipizacija istog RFLP metodom, niti potvrda hipoteze o genu *nimA*, kao najčešćem tipu gena *nim*.
- Gen rezistencije *cepA* je statistički značajno zastupljeniji u *B. fragilis* podgrupi, negoli u *B. non-fragilis* podgrupi, i svi izolati s *cepA* genom, osim jednog su rezistentni na ampicilin.
- Za gene rezistencije *cfiA* i *tetQ* nije pronađena statistički značajna razlika u zastupljenosti između podgrupa *B. fragilis* i *B. non-fragilis*.
- U jedinom izolatu (*B. fragilis*) s genom *cfiA* zabilježena je umjerena rezistencija na imipenem.
- Većina izolata s genom *tetQ* je osjetljiva na tigeciklin.
- Razlika u zastupljenosti gena rezistencije *ermF* je na granici statističke značajnosti, $p = 0.058$. Za očekivati je da bi nešto veći uzorak donio i statistički značajan rezultat, sa zaključkom da je gen *ermF* zastupljeniji u *B. non-fragilis* podgrupi u odnosu na *B. fragilis* podgrupu.
- Svi izolati s genom *ermF*, osim jednog, su rezistentni na klindamicin.
- Prema rezultatima ispitivanja antimikrobne osjetljivosti u *B. fragilis* grupi, većina izolata je rezistentna na ampicilin i klindamicin; izolati rezistentni na amoksicilin s klavulanskom kiselinom, imipenem, moksifloksacin i tigeciklin su rijetki, a rezistentnih izolata na piperacilin s tazobaktamom također nema.
- In vitro indukcija rezistencije na metronidazol postignuta je u sojevima *B. fragilis* grupe bez *nim* gena.

- Mogućnost indukcije rezistencije u sojevima bez *nim* gena, uz najvišu vrijednosti MIK-a metronidazola 96 mg/L i stabilnost rezistencije, ne potvrđuje ni hipotezu o indukciji rezistencije u sojevima s *nim* genom i vrijednosti MIK-a metronidazola ≥ 256 mg/L.
- U većine sojeva s induciranom rezistencijom na metronidazol nalazi se statistički značajan pad aktivnosti LDH, što bi se moglo objasniti uz pretpostavku da indukcija uzrokuje samo fiziološke, ne i genetske promjene.
- U samo jednom soju *B. fragilis* grupe s induciranom rezistencijom na metronidazol značajno je povišena aktivnosti LDH, što bi možda moglo biti posljedica određene genetske mutacije.
- Rezultati ove studije donose tek početne spoznaje o mehanizmima rezistencije u procesu indukcije i zahtijevaju daljnja proučavanja istih nakon *in vitro* izlaganja sojeva *B. fragilis* metronidazolu, npr. enzima piruvat:feredoksin oksidoreduktaze.

8. SAŽETAK

8.1. Sažetak na hrvatskom jeziku

Ovaj rad se temelji na probiru *nim* gena rezistencije unutar *Bacteroides fragilis* grupe, *in vitro* indukciji rezistencije na metronidazol u sojevima koji su fenotipski osjetljivi na metronidazol i mjerenju aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u sojevima s induciranom rezistencijom na metronidazol.

Nim geni rezistencije i njihov produkt 5-nitroimidazol reduktaza najviše su istraživani mehanizam rezistencije unutar *B. fragilis* grupe. Djelovanjem 5-nitroimidazol reduktaze metronidazol se pretvara u aminoderivat, koji je netoksičan za DNK bakterijske stanice.

Osim što su svi ispitivani sojevi osjetljivi na metronidazol, niti u jednom nije detektiran *nim* (A-E) gen rezistencije. Iz tog razloga nije moguća tipizacija istih RFLP metodom, niti potvrda hipoteze o *nimA* genu, kao najčešćem tipu *nim* gena.

In vitro indukcija rezistencije na metronidazol postignuta je u sojevima bez *nim* gena, nakon višekratnog izlaganja sojeva subinhibitornim koncentracijama metronidazola u hranjivoj podlozi. Vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) metronidazola u induciranim sojevima bila je u rasponu 8 - 96 mg/L. Mogućnost indukcije rezistencije u sojevima bez *nim* gena, uz najvišu vrijednosti MIK-a metronidazola 96 mg/L, ne potvrđuje ni hipotezu o indukciji rezistencije u sojevima s *nim* genom i vrijednosti MIK-a metronidazola ≥ 256 mg/L.

U jednom jedinom soju s induciranom rezistencijom na metronidazol izmjeren je značajan porast vrijednosti LDH. U većine ostalih induciranih sojeva izmjereni pad vrijednosti LDH je u suprotnosti s dosadašnjim nalazima gdje se uz povišeni MIK metronidazola bilježi porast aktivnosti LDH kao kompenzacija smanjene aktivnosti PFOR kompleksa. Pretpostavlja se da je u dotičnom soju sa značajno povišenom vrijednosti LDH riječ o genetskoj mutaciji proteina koji su uključeni u proces redukcije metronidazola, a da u svim ostalim sojevima indukcija rezistencije uzrokuje samo promjene u regulaciji fizioloških procesa, vezanim za redukciju metronidazola.

Rezultati ovog rada donose tek početne spoznaje u mehanizme rezistencije u procesu indukcije rezistencije na metronidazol u *B. fragilis* grupi bez *nim* gena i zahtijevaju daljnje napore u proučavanju istih nakon *in vitro* izlaganja sojeva antibiotiku.

8.2. Sažetak na engleskom jeziku (Summary)

Title: Molecular analysis of *nim* genes and inducible metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* clinical isolates

Aleksandra Presečki Stanko, 2017.

The study is essentially based on detection of *nim* genes in *B. fragilis* group strains, *in vitro* induction of resistance to metronidazole in strains which are phenotypically sensitive to metronidazole and measurement of LDH activity in strains with induced resistance to metronidazole.

All strains were *nim*-gene negative, as well as sensitive to metronidazole.

In-vitro induction of metronidazole resistance is selected in *nim*-negative strains, after repeated exposure to subinhibitory concentrations of metronidazole incorporated into growth medium. The MIC values for metronidazole of the induced strains ranged from 8 to 96 mg/L.

Only one *B. fragilis* strain with induced resistance to metronidazole demonstrated an emergent increase in LDH activity. We believe that genetic mutations were responsible for the increased activity. A significant decrease in LDH activity of the most other strains was contrary to previous findings in which, underlying higher metronidazole MICs, an increase in LDH activity compensated for the decreased activity of PFOR complex. These findings could be explained if the induction caused only physiologic and not genetic changes.

These results provide the first insights into the mechanisms of metronidazole resistance during the exposure of *nim*-negative strains to antibiotic, that have been observed, but not investigated in detail, by other authors.

9. LITERATURA

1. Winn W (editor): The Anaerobic Bacteria. In: Koneman' color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P et al. Lippincott Williams &Wilkins; 2006. p 709-785
2. Kalenić S, Beader N, Senji P. Anaerobne bakterije. Bacteroidaceae. Klostridiji. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E, urednici. Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2001. str. 269-92.
3. Wexler HM. *Bacteroides fragilis*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621.
4. Finegold SM. Anaerobic bacteria in human disease. New York: Academic Press, 1977.
5. Hopkins M, Macfarlane G. Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. Appl Environ Microbiol. 2003;69:1920-7.
6. Finegold SM, George WL. Anaerobic infection in humans. San Diego: Academic Press, 1989.
7. Beader N, Plečko V. Gram-negativne anaerobne bakterije. U: Kalenić S, urednik. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 266-70.
8. Sóni J, Gal M, Brazier JS, Rotimi VO, Urbán E, Nagy E et al. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. J Antimicrob Chemother. 2006;57:212-20.
9. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJ et al. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). Clin Infect Dis. 2010;50:S26-33.
10. Fang H, Edlund C, Hedberg M, Nord CE. New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group. Int J Antimicrob Agents. 2002;19:361-70.
11. Ingham HR, Eaton S, Venables CW, Adams PC. *Bacteroides fragilis* resistant to metranidazole after long-term therapy. Lancet. 1978;1(8057):214.

12. Seifert H, Dalhoff A. German multicentre survey of the antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group and *Prevotella* species isolated from intra-abdominal infections: results from the PRISMA study. J Antimicrob Chemother. 2010;65:2405-10.
13. Land KM, Johnson PJ. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. Drug Resistance Updates. 1999;2:289-94.
14. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. J Antimicrob Chemother. 2004;54:109-16.
15. Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PL, Santos-Filho J et al. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. Anaerobe. 2010;16:190-4.
16. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis. 2010;50(S1):S16-23.
17. Theron MM, Rensburg MNJ, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). J Antimicrob Chemother. 2004;54:240-2.
18. Urbán E, Horvath Z, Sóki J, Lazar G. First hungarian case of an infection caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* strain. Anaerobe. 2015;31:55-8.
19. Husain F, Veeranagouda Y, Hsi J, Meggersee R, Abratt V, Wexler H. Two multidrug-resistant clinical isolates of *Bacteroides fragilis* carry a novel metronidazole resistance *nim* gene (*nimJ*). Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3767-74.
20. Nakano V, Nascimento e Silva A, Merino VRC, WexlerHM, Avila-Campos MJ. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. Clinics. 2011;66(4):543-7.
21. Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier JP, Grollier G et al. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and desription of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:60-4.

22. Sóki J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord C. Examination of *cfiA* mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:497-502.
23. Stubbs SL, Brazier JS, Talbot PR, Duerden BI. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3209-13.
24. Dubreuil L, Odou MF. Anaerobic bacteria and antibiotics: What kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow? *Anaerobe*. 2010;16(6):555-9.
25. Trinh S, Reysset G. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2078-84.
26. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1253-6.
27. Schaumann R, Petzold S, Fille M, Rodloff AC. Inducible metronidazole resistance in *nim*-positive and *nim*-negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing Columbia agar plates. *Infection*. 2005;33(5-6):368-72.
28. Liu CY, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lyn HY, Hsueh PR. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3161-8.
29. Johansson A, Nagy E, Sóki J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2014;63:1105-10.
30. Schapiro JM, Gupta R, Stefansson E, Fang FC, Limaye AP. Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nimA* nitroreductase gene from a patient in Washington State. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4127-9.

31. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, Snyderman DR. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis. 2000;30:870–6.
32. Sóki J, Fodor E, Hecht DW, Edwards R, Rotimi VO, Kerekcs I et al. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. J Med Microbiol. 2004;53:413-9.
33. Kalenić S: Laboratorijska dijagnostika bakterijskih infekcija. U: Kalenić S, urednik. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 71-8.
34. Jousimies-Somer H (editor): Advanced Identification Methods. In: Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6th ed. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Star Publishing Company; 2002. p. 81-130.
35. Brooks GF (editor): Infections caused by anaerobic bacteria. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical microbiology, 26th ed. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Meitzner TA. Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies; 2013. p. 295-302.
36. Aldridge KE, Sanders CV. Susceptibility trending of blood isolates of the *Bacteroides fragilis* group over a 12-year period to clindamycin, ampicillin-sulbactam, cefoxitin, imipenem, and metronidazole. Anaerobe. 2002;8:301-5.
37. Sears C. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. Clin Microbiol Rev. 2009;22:349-69.
38. Josić D, Kovač S. Masena spektrometrija molekulskog oslikavanja. Kem Ind. 2009;58(5):207-13.
39. Kalenić S, Bedenić B. Antibakterijski lijekovi. U: Kalenić S, urednik. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 97-116.
40. Müller M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. Biochem Pharmac. 1986;35:37-41.
41. Reyssset G. Genetics of 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* species. Anaerobe. 1996;2:59-69.

42. Carlier JP, Sellier N, Rager MN, Reyssset G. Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1495-9.
43. Edwards DI. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. J Antimicrob Chemother. 1993;31:9-20.
44. Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole: a therapeutic review and update. Drugs. 1997;54:679-708.
45. Sisson G, Jeong J, Goodwin A, Bryden L, Rossier N, Lim-Morrison S et al. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned H. pylori *rdxA* + (nitroreductase) gene. J Bacteriol. 2000;182:5091-6.
46. Edwards DI. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms I. Mechanism of resistance. J Antimicrob Chemother. 1993;31:201-10.
47. Upcroft J, Dunn LA, Wright J, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. 5-nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:344-7.
48. Diniz CG, Farias LM; Carvalho MAR, Rocha ER, Smith CJ. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. J Antimicrob Chemother. 2004;54:100-8.
49. Hedberg M, Nord C. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003;9:475-88.
50. Haggoud A, Reyssset G, Azeddoug H, Sebald M. Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:1047-51.
51. Reyssset G, Haggoud A, Su W, Sebald M. Genetic and molecular analysis pIP417 and pIP419: *Bacteroides* plasmids encoding 5-nitroimidazole resistance. Plasmid. 1992;27:181-90.
52. Trinh S, Haggoud A, Reyssset G, Sebald M. Plasmids pIP419 and pIP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. Microbiol. 1995;141:927-35.

53. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:561-8.
54. Sydenham TV, Sóki J, Hasman H, Wang M, Justesen US. Identification of antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant clinical *Bacteroides fragilis* isolates by whole genome shotgun sequencing. *Anaerobe*. 2015;31:59–64.
55. Sóki J, Eithel Z, Urbán E, Nagy E, ESCMID Group on Anaerobic Infections. Molecular analysis of carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:122-5.
56. Nagy E, Urbán E, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*. 2010;17:371-9.
57. Galvão BPGV, Meggersee RL, Abratt VR. Antibiotic resistance and adhesion potential of *Bacteroides fragilis* clinical isolates from Cape Town, South Africa. *Anaerobe*. 2011;17:142-6.
58. Podglajen I, Breuil J, Rohaut A, Monsempes C, Collatz E. Multiple mobile promoter regions for the rare carbapenem resistance gene of *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol*. 2001;183:3531-5.
59. Sóki J, Gonzales S, Urbán E, Nagy E, Ayala J. Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2492-500.
60. Tran C, Tanaka K, Watanabe K. PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *J Infect Chemother*. 2013;19:279-90.
61. Rasmussen B, Keeney D, Yang Y, Bush K. Cloning and expression of a cloxacillin hydrolyzing enzyme and a cephalosporinase from *Aeromonas sobria* AER 14M in *Escherichia coli*: requirement for an *E. coli* chromosomal mutation for efficient expression of the class D enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38: 2078-85.

62. Jenkins S. Infections due to anaerobic bacteria and the role of antimicrobial susceptibility testing of anaerobes. *Rev Med Microbiol.* 2001;12:1-12.
63. Salyers A, Speer B, Shoemaker N. A new perspective in tetracycline resistance. *Mol Microbiol.* 1990;4:151-6.
64. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clin Infect Dis.* 1993;16(S1):S390-400.
65. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis.* 1997;24(1):S110-20.
66. Yang W, Moore I, Koteva K, Bareich D, Hughes D, Wright G. TetX is a flavindependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52346-52.
67. Bartha N, Sóki J, Urbán E, Nagy E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:522-5.
68. Hawser S, Hackel M, Hoban D. Antibiotic susceptibility profiles of European *Bacteroides fragilis* with reduced carbapenem susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:803-4.
69. Pal S. A journey across the sequential development of macrolides and ketolides related to erythromycin. *Tetrahedron.* 2006;62:3171-200.
70. Nakayima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolid antibiotics. *J Infect Chemother.* 1999;5:61-74.
71. Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe.* 2013;21:43-9.
72. Ricci V, Piddock LJV. Program and abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1998. Characterization of the quinolone resistance determining regions of *gyrA* of *Bacteroides fragilis* and their role in fluoroquinolone resistance, abstr. C180; p. 121.

73. Miyamae S, Nikaido H, Yoshinobu T, Yoshimura F. Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:2119–21.
74. Koneman EW (editor): Introduction to microbiology. Part I: The role of microbiology laboratory in the diagnosis of infectious diseases: Guidelines to practice and management.. In: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Lippincott Williams &Wilkins; 1997. p. 69-120.
75. Jousimies-Somer H (editor): Susceptibility Testing of Anaerobic bacteria. In: Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6th ed. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Star Publishing Company; 2002. p. 143-164.
76. Goldstein EJC, Citron DM, Hecht DW. Antimicrobial resistance of anaerobic bacteria. In: Fong IW, Drlica K, editors. Antimicrobial resistance and implications for the twenty-first century. New York (NY): Springer; 2008. p. 207–29.
77. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 7th ed. Approved Standard. Document M11-A7. Wayne (PA); 2007.
78. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0; 2016.
79. Abbe K, Takahashi S, Yamada T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. J Bacteriol. 1982;152:175-82.
80. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. Anaerobe. 2015;31:31-6.
81. Hartmeyer GN, Sóki J, Nagy E, Justesen US. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? J Med Microbiol 2012;61:1784–88.
82. Toprak NU, Uzunkaya OD, Sóki J, Soyletir G. Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (*cfiA*) and metronidazole (*nim*) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. Anaerobe. 2012;18(1):169-71.

83. Nagy E, Sóki J, Urbán E, Szoke I, Fodor E, Edwards R. Occurrence of metronidazole and imipenem resistance among *Bacteroides fragilis* group clinical isolates in Hungary. *Acta Biol Hung*. 2001;52:271-80.
84. Wojcik-Stojek B, Bulanda M, Martirosian G, Heczko P, Meisel-Mikolajczyk F. In vitro antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* strains isolated from excised appendix of patients with phlegmonous or gangrenous appendicitis. *Acta Microbiol Pol*. 2000;49:171-5.
85. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJ, Harrell L et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *Anaerobe*. 2011;17(4):147-51.
86. Vieira BD, Boente RF, Rodrigues MK, Avelar KE, Domingues R, Ferreira M. Decreased susceptibility to nitroimidazoles among *Bacteroides* species in Brasil. *Curr Microbiol*. 2006;52:27-32.
87. Chauldry R, Mathur P, Dhawan B, Kumar L. Emergence of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis*. *India Emerging Infect Dis*. 2001;7:485-6.
88. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81.
89. Wexler HM. Pump it up: occurrence and regulation of multi-drug efflux pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe*. 2012;18(2):200-8.
90. Pumbwe L, Wareham DW, Aduse-Opoku J, Brazier JS, Wexler HM. Genetic analysis of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:183-9.
91. Katsandri A, Papaparaskevas J, Pantazatou A, Petrikkos GL, Thomopoulos G, Houholua DP et al. Two cases of infections due to multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* group strains. *J Clin Microb*. 2006;44(9):3465-7.
92. Treviño M, Areses P, Peñalver MD, Cortizo S, Pardo F, del Molino ML et al. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe*. 2012;18(1):37-43.

93. Tambić Andrašević A, Tambić T (urednici). Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2014. Akademia medicinskih znanosti Hrvatske, 2015.
94. Sóki J, Edwards R, Urbán E, Fodor E, Nagy E. A clinical isolate of *Bacteroides fragilis* from Hungary with high-level resistance to imipenem. J Med Microbiol. 2001;5:107.
95. Sóki J, Urbán E, Szöke I, Fodor E, Nagy E. Prevalence of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical and normal flora isolates of *Bacteroides* species in Hungary. J Med Microbiol. 2000;49(5):427-30.
96. Narikawa S, Suzuki T, Yamamoto M, Nakamura M. Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. J Antimicrob Chemother. 1991;28:47-53.
97. Leitsch D, Sóki J, Kolarich D, Urbán E, Nagy E. A study on *nim* expression in *Bacteroides fragilis*. Microbiol. 2014;160:616–22.
98. Presečki Stanko A, Sóki J, Varda Brkić D, Plečko V. Lactate dehydrogenase activity in *Bacteroides fragilis* group strains with induced resistance to metronidazole. J Glob Antimicrob Resist. 2016;5:11-4.
99. Samuelson J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1533-41.
100. Tabaqchali S, Pantosti A, Oldfield S. Pyruvate dehydrogenase activity and metronidazole susceptibility in *Bacteroides fragilis*. J Antimicrob Chemother. 1983;11:393-400.
101. Skarin A, Mårdh PA. Scanning electron microscopic examination of *Bacteroides fragilis* and *Gardnerella vaginalis* after exposure to concentration gradients of metronidazole and tinidazole. Scand J Infect Dis. 1981;26 Suppl:S54-9.
102. Ferreira MC, Domingues MCP, de Uzeda M. Influence of metronidazole, chloramphenicol, clindamycin and penicillin G on growth and neuraminidase activity of *Bacteroides fragilis*. J Antimicrob Chemother. 1989;24:157-64.

10. PRILOZI

10.1. Popis slika

Slika 1. Kemijska struktura metronidazola (1-(β -hidroksietil)-2-metil-5-nitroimidazol)	7
Slika 2. Put aktivacije metronidazola procesom redukcije	8
Slika 3. Mjesto djelovanja piruvat:feredoksin oksidoredukcijskog kompleksa u nastanku reduciranog oblika metronidazola.....	9
Slika 4. Redukcija metronidazola u aminoderivat, djelovanjem produkta <i>nim</i> gena	10
Slika 5. Mapa plazmida pIP421 i regije <i>nimD</i> gena)	12
Slika 6. Gel elektroforeza produkta umnožavanja <i>cepA</i> gena	56
Slika 7. Gel elektroforeza produkta umnožavanja <i>cfiA</i> gena	57
Slika 8. Gel elektroforeza produkta umnožavanja <i>tetQ</i> gena.....	58
Slika 9. Gel elektroforeza produkta umnožavanja <i>ermF</i> gena	59

10.2. Popis tablica

Tablica 1. Izračun niza dvostrukih razrjeđenja antibiotika, koji je inkorporiran u podlogu za izradu antibiograma.....	30
Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije za pojedine gene rezistencije (nim (A-E), cepA, cfiA, ermF, tetQ)	38
Tablica 3. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika i geni rezistencije svakog pojedinog <i>B. fragilis</i> izolata.....	41
Tablica 4. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika i geni rezistencije svakog pojedinog <i>B. non-fragilis</i> izolata.....	42
Tablica 5. Rezultat testiranja osjetljivosti na ostala antimikrobna sredstva izolata <i>B. fragilis</i> grupe	45
Tablica 6. Rezultat probira na ostale gene rezistencije izolata <i>B. fragilis</i> grupe.....	49
Tablica 7. Distribucija ostalih gena rezistencije između <i>B. fragilis</i> i <i>B. non-fragilis</i> izolata i povezanost gena s izolatima rezistentnim na ampicilin, imipenem, klindamicin i tigeciklin	51
Tablica 8. Karakteristike sojeva <i>Bacteroides</i> spp. sa stečenom inducibilnom rezistencijom na metronidazol i MIK metronidazola u originalnim i induciranim sojevima	53
Tablica 9. Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u originalnim i sojevima <i>Bacteroides</i> spp. s induciranom rezistencijom na metronidazol	55

10.3. Popis dijagrama

Dijagram 1.	Rezultat testiranja osjetljivosti na ostala antimikrobna sredstva izolata <i>B. fragilis</i> grupe	46
Dijagram 2.	Rezultat probira na ostale gene rezistencije izolata <i>B. fragilis</i> grupe	50

11. ŽIVOTOPIS

Aleksandra Presečki Stanko rođena je 13. studenoga 1969. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i jezičnu gimnaziju.

Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1994.

Obvezni pripravnički staž u trajanju od dvije godine odradila je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Državni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravlja položila je 1996.

U razdoblju 1997.-2001. radila je kao liječnik obiteljske medicine u Domu zdravlja Centar, Zagreb.

Godine 2001. započela je program specijalizacije iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom u KBC-u Zagreb, a 2006. položila je specijalistički ispit.

Iste godine zasnovala je radni odnos u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb, radno mjesto liječnik specijalist-mikrobiolog.

Akadske godine 2005/2006. upisala je znanstveni poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je uspješno položila sve predviđene ispite.

Sudjeluje u raznim oblicima trajne i sustavne izobrazbe (kongresi, tečajevi prve kategorije, seminari, simpoziji, predavanja).

Član je Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju i Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESCMID), radna skupina za anaerobne infekcije (ESGAI).

Udana je i majka troje djece.