

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU

Mr Ksenija Aksentijević

ISPITIVANJE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE
KOD SOJEVA BAKTERIJA IZOLOVANIH OD RIBA
POREKLOM IZ RAZLIČITIH SREDINA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

Mr.Sci. Ksenija Aksentijević

**STUDY OF ANTIBIOTICS RESISTANCE IN
BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM FISH
COLLECTED FROM DIFFERENT ENVIRONMENTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR: dr Dušan Mišić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju

ČLANOVI KOMISIJE:

1. dr Dušan Mišić, vanredni profesor Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
2. dr Maja Marković, vanredni profesor Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
3. dr Jakov Nišavić, vanredni profesor Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
4. dr Ružica Ašanin, redovni profesor u penziji, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
5. dr Mirjana Lenhardt, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković,,Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

ISPITIVANJE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE KOD SOJEVA BAKTERIJA IZOLOVANIH OD RIBA POREKLOM IZ RAZLIČITIH SREDINA

Kratak sadržaj:

U ovom ispitivanju vršeno je uzorkovanje briseva poreklom od klinički zdravih riba koje su poticale iz različitih sredina (ribnjaci, akvarijumi, riblje pijace). Izvršena je izolacija bakterija koje su sastavni deo mikrobioma kože, škrge i creva riba i ispitivana je osetljivost ovih bakterija na određeni broj antibiotika koji se koriste u veterinarskoj i humanoj medicinskoj praksi. Precizna identifikacija ispitivanih sojeva bakterija vršena je primenom metoda PCR, sekvenciranje gena za 16S rRNK, MALDI-TOF. Primenom disk difuzionog testa i E testa ispitivano je fenotipsko ispoljavanje rezistencije na karbapeneme, ureidopeniciline sa i bez inhibitora beta-laktamaza, cefalospirine III i IV generacije, aminoglikozide, tetraciklin, kolistin, flurohinolone i hloramfenikol. Prisustvo gena rezistencije, njihova lokalizacija (na hromozomu ili na mobilnim genetičkim elementima) vršena je primenom metode PCR. Kod sojeva koji su ispoljili rezistenciju na nabrojane antibiotike traženi su plazmidi i ispitivana je konjugabilnost izolovanih plazmida. Posmatrano na ukupan broj ispitanih sojeva u ovom istraživanju, bez obzira na rod i vrstu bakterija, ukupno je nađeno 55% sojeva koji su bili osetljivi na sve antibiotike, kod 22,8% sojeva nađena je rezistencija na 3 do 16 antibiotika uključujući i antibiotike koji se koriste isključivo kod ljudi (karbapenemi, ureidopenicilini, cefalosporini III i IV generacije). Ukupno 22,2% sojeva bilo je rezistentno na 1 do 2 antibiotika, mada je i među tim sojevima bilo onih koji su bili rezistentni na antibiotike registrovane samo za upotrebu kod ljudi (ceftazidim, piperacilin). Kod soja *A. hydrophila* izolovanom iz akvarijumske ribice gupi potvrđen je mehanizam rezistencije nalazom gena *rmtB* koji je bio lokalizovan na transpozonu Tn1548 smeštenom na konjugabilnom plazmidu koji je po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Kod sojeva *Pseudomonas* koji su bili rezistentni na karbapeneme, ureidopeniciline sa i bez inhibitora beta-laktamaza, kao i na cefalosporine III i IV generacije, nisu nađeni geni za, karbapenemaze, MBL, ESBL, OXA i AmpC beta-laktamaze (KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58, VIM, IMP, SPM, GIM, NDM, TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9, OXA-1, OXA-9, AmpC grupni kao i pojedinačni-MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM). Na osnovu dobijenih rezultata primenom E testa, kod 3 soja

iz roda *Pseudomonas* izolovanih od šarana nađena je rezistencija na kolistin sa dobijenim vrednostima MIK 4 µg/mL.

Ključne reči: ribe, antibiotici, rezistencija

Naučna oblast: Preventivna veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Bolesti riba, Mikrobiologija; Rezistencija bakterija

UDK broj: 579.62:597.2:577.181

STUDY OF ANTIBIOTICS RESISTANCE IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM FISH COLLECTED FROM DIFFERENT ENVIRONMENTS

Summary

During this research, a series of microbiological smears was collected from clinically healthy fish found in different environments (aquaculture ponds, aquariums, and fish markets) has been done. Bacteria which belong to skin microbiome, gills, and fish intestines have been isolated, and their sensitivity to several antibiotics used in veterinary and human practice has been tested. Precise identification of tested strains of bacteria has been performed with PCR method, 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF. Phenotypical manifestation of resistance to carbapenems, ureidopenicillins (with and without inhibitors of beta-lactamase), cephalosporins of the third and fourth generation, aminoglycosides, tetracyclines, colistin, fluoroquinolones and chloramphenicol has been tested using disc diffusion method and E test. Presence of resistant genes, their localization (on chromosome or on mobile genetic elements) has been conducted with PCR method. For strains showing resistance to the antibiotics mentioned above, plasmids have been searched and conjugation of isolated plasmids has been tested. Observing the total number of tested strains in this research, regardless of the genus and species of bacteria, 55% of examined strains were found to be sensitive to all antibiotics, and in 22.8% of strains resistance was observed to 3-16 antibiotics, including antibiotics used exclusively in human medicine (carbapenems, ureidopenicillins, cephalosporins of third and fourth generation). In additional 22.2% of strains the resistance to 1 or 2 antibiotics was recorded, including resistance to antibiotics registered for exclusive use in human medicine (ceftazidime, piperacillin). In *A. hydrophila* strain isolated from aquarium fish guppy that showed resistance to all 16 antibiotics, a mechanism of resistance has been confirmed by identifying gene *rmtB* which has been localized on transposon Tn1548 located on conjugal plasmid which belongs to group IncL/M type of replicon. In *Pseudomonas* strains resistant to carbapenems, ureidopenicillins (with and without inhibitors of beta-lactamase), cephalosporins of third and fourth generation, the genes for carbapenemases MBL, ESBL, OXA and AmpC beta-lactamases (KPC, OXA-23,

OXA-24, OXA-40, OXA-58, VIM, IMP, SPM, GIM, NDM, TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9, OXA-1, OXA-9, group AmpC and specific MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM) have not been found. Based on results obtained with use of E test, resistance to colistin has been found in 3 strains of *Pseudomonas* spp. isolated from carp with MIC values of 4 µg/mL.

Key words: fish, antibiotics, resistance

Scientific field: Preventive veterinary medicine

Narrower scientific field: Fish diseases, Microbiology, Bacterial resistance to antibiotics

UDK number: 579.62:597.2:577.181

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Rezistencija bakterija na antibiotike	5
2.2. Tipovi rezistencije bakterija na antibiotike.....	7
2.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike	9
2.3. a) Enzimska inaktivacija antibiotika.....	9
b) Modifikacija ili zamena ciljnog mesta delovanja antibiotika.....	10
c) Efluks pumpa.....	10
d) Redukcija prolaska molekula antibiotika u ćeliju.....	10
e) Zaštita ciljnog mesta delovanja antibiotika	11
f) Hvatanje antibiotika u zamku i titracija antibiotika	11
g) Kombinovani mehanizmi rezistencije	12
2.4. Uloga mobilnih genetičkih elemenata u širenju rezistencije	12
2.5. Plazmidi i njihov značaj u širenju gena rezistencije kod bakterija	13
2.5.1. Definicija plazmida i njihov značaj u evoluciji	13
2.5.2. Otkriće plazmida, njihova struktura i klasifikacija	14
2.5.3. Širenje plazmida i gena rezistencije u prirodi.....	16
a) Transdukcija.....	17
b) Transformacija.....	17
c) Konjugacija.....	20
2.6. Značaj ostalih mobilnih genetičkih elemenata u širenju rezistencije.....	22
2.7. Rezistencija na antibiotike kod sojeva <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> i <i>Aeromonas</i> vrsta poreklom od riba	22
2.8. Beta laktamaze proširenog spektra delovanja (ESBL)	26
2.9. Karbapenemaze.....	28
2.10. Stečene 16S rRNK metiltransferaze kod gram negativnih bakterija	30
2.10.1. Prvi opis i nomenklatura	31
2.10.2. Klinički značaj i nomenklatura	32
2.10.3. Zastupljenost i raširenost stečenih 16S rRNK metiltransferaza	34
2.10.4. Rezervoari i putevi širenja stečenih 16S rRNK metiltransferaza	34
2.10.5. Lokacija gena za 16S rRNK metiltransferaze.....	35

2.11. Otpadne vode kao rezervoara bakterija otpornih na antibiotike.....	37
2.12. Antibiotici	39
2.13. Akvakultura.....	43
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	46
4. MATERIJAL I METODE	47
4.1. Sojevi bakterija koji su ispitivani.....	47
4.2. Izolacija i identifikacija primenom konvencionalnih metoda.....	47
4.3. Identifikacija primenom metode standardne lančane reakcije polimeraze PCR	48
4.4. Izolacija i karakterizacija bakterijskih izolata 16S rRNK sekvenciranjem	50
4.5. Identifikacija primenom metode MALDI-TOF	50
4.6. Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike u uslovima <i>in vitro</i>	51
4.6.1. Disk difuziona metoda	51
a) Princip metode	51
b) Procedura izvođenja	52
c) Očitavanje rezultata	53
d) Kontrola kvaliteta disk difuzione metode.....	54
4.6.2. E test.....	55
a) Princip metode	55
b) Procedura izvođenja	56
c) Očitavanje rezultata	56
d) Kontrola kvaliteta	56
4.6.3. Fenotipska metoda otkrivanja prisustva KPC karbapenemaza, metalo beta laktamaza (MBL), AmpC i OXA-48 beta laktamaza pomoću Rosco Diagnostica tableta.....	57
4.6.3.1. KPC/ MBL i OXA-48 potvrdni test	57
a) Princip metode	57
b) Procedura izvođenja	57
c) Očitavanje rezultata	58
4.6.3.2. KPC/ MBL i OXA-48 potvrdni test za <i>P.aeruginosa/Acinetobacter</i>	60
a) Princip metode	60
b) Procedura izvođenja	61
c) Očitavanje rezultata	62
4.6.3.3. AmpC potvrdni test	60
a) Princip metode	64

b) Procedura izvođenja	64
c) Očitavanje rezultata	64
4.6.4.. Ispitivanje prisustva beta – laktamaza proširenog spektra delovanja odnosno (ESBL test).....	65
a) Princip metode	65
b) Procedura izvođenja	65
c) Kontrola kvaliteta	67
4.7. Ispitivanje prisustva plazmida kod sojeva poreklom od riba.....	67
4.7.1. Sojevi bakterija koji su ispitivani.....	67
4.7.2. Metoda za izolaciju plazmida, princip i procedura izvođenja	67
4.7.3. Određivanje veličine dobijenih plazmida	68
4.8. Transformacija kompetentnih ćelija plazmidima izolovanim iz sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	70
4.8.1. Procedura izvođenja transformacije.....	71
4.8.2. Očitavanje rezultata	72
4.9. Konjugacija.....	72
4.9.1. Procedura izvođenja konjugacije	72
4.10. Ispitivanje prisustva gena odgovornih za različite mehanizme rezistencije metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)	72
4.10.1. Ispitivanje prisustva gena za 16S rRNK metiltransferaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR).....	73
4.10.2. Ispitivanje prisustva gena za metalo beta laktamaze (VIM, IMP, SPM, GIM) i gena za beta laktamaze proširenog spektra delovanja (TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9) OXA-1 i OXA-9 beta-laktamaze, karbapenemaze (OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58) metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR).....	73
4.10.3. Ispitivanje prisustva gena za karbapenemaze (KPC, NDM) metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)	74
4.10.4. Ispitivanje prisustva gena za AmpC beta laktamaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR).....	75
5. REZULTATI.....	78
5.1. Izolacija i identifikacija sojeva bakterija koji su ispitivani.....	78
5.1.1. Rod <i>Pseudomonas</i>	79
5.1.2. Rod <i>Stenotrophomonas</i>	79
5.1.3. Rod <i>Aeromonas</i>	79

5.1.4. Rod <i>Acinetobacter</i>	79
5.1.5. Familija <i>Enterobacteriaceae</i>	79
5.1.6. Sporni sojevi	80
5.2. Rezultati standardne lančane reakcije polimeraze PCR, 16S rRNK sekvenciranja gena i metode masene spektrometrije MALDI – TOF	81
5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike primenom disk difuzione metode	86
5.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda <i>Pseudomonas</i> izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	86
5.3.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda <i>Stenotrophomonas</i> izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	87
5.3.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda <i>Aeromonas</i> izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	89
5.3.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda <i>Acinetobacter</i> izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	90
5.3.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva koji pripadaju familiji <i>Enterobacteriaceae</i> izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	91
5.3.6. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva koji su sporni izolovanih od riba primenom disk difuzione metode	91
5.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike primenom E testa	93
5.5. Rezultati ispitivanja prisustva beta laktamaza (KPC, M β L, OXA-48, AMPC) fenotipskom metodom potvrdnog testa Rosco Diagnostica	94
5.6. Rezultati ispitivanja prisustva gena za 16S rRNK metiltransferaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)	95
5.7. Rezultati ispitivanja prisustva gena za beta laktamaze proširenog spektra delovanja (TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9), OXA-1 i OXA-9 beta-laktamaze, karbapenemaze (KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58) u koje spadaju i metalo beta laktamaze (NDM, VIM, IMP, SPM, GIM), AmpC beta laktamaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)	96
5.8. Rezultati ispitivanja prisustva plazmida i određivanje njihove veličine	96
5.8. Rezultati transformacije i konjugacije	96
6. DISKUSIJA	98
7. ZAKLJUČCI	106
8. SPISAK LITERATURE	108

1. UVOD

Jedan od najvažnijih primera slučajnog otkrića u nauci je pronalazak prirodnih antibiotika od strane Aleksandra Fleminga. Iako Fleming uživa reputaciju nekoga ko je otkrio penicilin 1928. godine, francuski student medicine Ernest Dišen (Ernest Duchesne), otkrio je antimikrobno svojstvo plesni *Penicillium* još 1896. godine. Posmatrao je arapskog konjušara koji je sedla držao u tamnim i vlažnim prostorijama da podstakne stvaranje buđi na njima, koja je kako je rekao pomagala u zarastanju rana od sedla. Znatizeljan, Dišen je pripremio suspenziju buđi i ubrizgao je u obolelog zamorca zajedno sa letalnom dozom virulentnog tifoidnog bacila i uprkos tome su sve životinje ostale zdrave. Međutim, njegov rad je ignorisan zbog njegove mladosti i nepoznatog statusa.

Termin „antibiotik” je prvi predložio Selman Waksman, čovek koji je otkrio streptomycin i bio pionir u istraživanju mikroorganizama zemljišta koji imaju sposobnost da proizvedu antibiotike. Taj termin kada ga on upotrebljava ne definiše klasu jedinjenja ili njegovu prirodnu ulogu, već samo njegov efekat. Sa rizikom da nas napadnu kolege tradicionalisti, opšti izraz „antibiotik” ovde će se koristiti da označi svaku klasu organskih molekula koji inhibišu ili ubijaju mikrobe, bez bilo kakvog razmatranja porekla određenog jedinjenja ili klase. Tako, će se i čisto sintetički terapeutici smatrati antibioticima.

Kao i u bilo kojoj oblasti biološkog istraživanja, istorija antibiotika je prepuna zabluda, pogrešnih tumačenja, pogrešnih predviđanja i drugih grešaka, koje su povremeno dovodile i do istine.

Uvođenje antibiotika u kliničku praksu, jedno je od najvećih medicinskih postignuća dvadesetog veka i dovelo je do revolucije u lečenju bakterijskih infekcija.

Od tada su otkriveni novi prirodni ali i stvoreni mnogi polusintetički i sintetički lekovi da bi se borili protiv bakterijskih infekcija. Ovi lekovi bili su važan kamen temeljac moderne medicine u drugoj polovini prošlog veka i spasli su milione ljudskih života od fatalnih bakterijskih infekcija i ublažili patnje pacijenata. Danas, lečenje bakterijskih infekcija postaje sve komplikovanije zbog toga što mikroorganizmi razvijaju otpornost na antibiotike širom sveta.

Nekoliko godina pre uvođenja penicilina u terapijske svrhe, bakterijska penicilinaza je identifikovana od strane dva člana tima koji su otkrili penicilin. Zanimljivo je da, otkriće bakterijske penicilinaze pre upotrebe antibiotika, sada može biti veoma važno u svetlu novih otkrića jer veliki broj antibiotskih r gena pripada prirodnoj bakterijskoj populaciji. Antimikrobna rezistencija (AMR) je otkrivena kod patogenih bakterija istovremeno sa prvim komercijalno proizvedenim antibiotikom poreklom od mikroorganizma, penicilinom.

Od uvođenja prvih efikasnih antibiotika još 1937. godine, a naročito sulfonamida, razvoj specifičnih mehanizama otpornosti je bacio senku na njihovu terapijsku primenu. Otpornost na sulfonamide prvo je prijavljena kasnih tridesetih godina prošlog veka a isti mehanizmi rade i 70 godina kasnije.

Mnoge patogene bakterije povezane sa epidemijama ljudskih bolesti razvile su forme otporne na više antibiotika kao posledica upotrebe antibiotika.

Mycobakterium tuberculosis je arhetipski humani patogen; evoluirao je sa ljudskom rasom i trenutno inficira jednu trećinu ljudske populacije. Dok je pionirsko otkriće streptomicina i izoniazida obezbedilo neophodan tretman, bio je ubrzan i razvoj otpornosti.

Kako su otkrivani drugi antibiotici i uvođeni u kliničku praksu, usledio je sličan tok događaja. Sojevi *M. tuberculosis* otporni na četiri ili više antibiotika prve linije odbrane pojavili su se i šire se ubrzano u poslednjoj deceniji. Postoje sojevi mikobakterijuma koji su otporni na sve antibiotike. Nema potvrđenih izveštaja o ulozi horizontalnog transfera gena u razvoju otpornosti *M. tuberculosis*, koja se javlja isključivo zbog spontanijih mutacija.

Neočekivano otkriće genetski prenosive otpornosti na antibiotike sredinom pedesetih godina prošlog veka u Japanu promenilo je celokupnu sliku uvođenjem jeretičkog genetskog koncepta da antibiotski r geni mogu biti rašireni konjugacijom bakterija kroz celu populaciju bakterijskih patogena (uz nekoliko izuzetaka). U nekoliko poslednjih godina prihvaćeno je da je razmena gena univerzalna osobina bakterija koja se dešavala tokom eona bakterijske evolucije. Otkriće prisustva prepoznatih bakterijskih genskih sekvenci eukariotskog genoma je povećalo saznanje o velikom uticaju horizontalnog transfera gena u evoluciji gena. Ne iznenađuje, što je plazmidom

posredovan transfer otpornosti na antibiotike bio glavni fokus istraživanja zbog svog medicinskog a od skora i praktičnog značaja.

Mikroorganizmi koji poseduju ove r gene prisutni su prirodno u svim ekološkim nišama. Otpuštaju se u vodu i zemljište a vode poreklo od drugih organizama, uključujući i ljude, gde se razvijaju ili povećavaju u izobilju pod direktnim selektivnim pritiskom antibiotika. Istovremeno, antibiotici, dezinfekciona sredstva i teški metali se takođe otpuštaju u vode, i mogu da deluju kao selektivni faktori koji podržavaju razvijanje novih AMR osobina. Stepem razlaganja antibiotika u okruženju varira i zavisi od različitih uslova sredine, na primer: temperature, dostupnog kiseonika, pH, prisustva alternativnog izvora organskog ili neorganskog otpada.

Geni rezistencije i bakterije otporne na antibiotike koje nose te gene mogu se prenositi sa životinja na ljude ali i iz staništa životinja (kako vodenih tako i kopnenih) u staništa ljudi i obrnuto. Ovaj fenomen može imati štetne efekte i na zdravlje ljudi i na zdravlje životinja.

Postepena pojava populacije patogenih bakterija otpornih na antibiotike usled upotrebe, pogrešne upotrebe i zloupotrebe antibiotika danas je postala glavni globalni zdravstveni problem. Smatra se da geni zaduženi za rezistenciju bakterija na antibiotike potiču od bakterija poreklom iz životne sredine, pošto su klinički važni geni rezistencije otkriveni na hromozomima ovih bakterija. Stoga, nema pojedinačnog rešenja za smanjenje problema otpornosti bakterija na antibiotike, već će biti potreban koordinisan multidisciplinarni pristup ovoj temi. Takođe se mora shvatiti da gde god da se antibiotici koriste, neminovno će uslediti i antimikrobna rezistencija. Oportunistički patogene bakterije kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. *Acinetobacter* spp. i *Burkholderia* spp. mogu da kombinuju urođenu otpornost na nekoliko antibiotika sa neverovatnom sposobnošću da steknu nove gene rezistencije. Ipak, malo se zna o raznolikosti, raspoređivanju i poreklu gena rezistencije naročito među bakterijama okruženja koje se još uvek ne mogu kultivisati.

Obilje gena rezistencije kod bakterija pronađenih u sistemu potoka može biti povezano sa unosom različitih otpadnih voda (bilo da su one prečišćene ili ne) demonstrirajući tako zagađenje velikih razmera u sistemu otvorenih voda bakterijama otpornim na antibiotike.

Rezultati koji se mogu naći u naučnoj literaturi ukazuju da se geni rezistencije koji nose plazmide mogu identifikovati kod patogenih bakterija rodova: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, i *Pseudomonas*, koji se mogu naći i u zemljištu i u vodi. Ovi plazmidi nose determinante otpornosti i na barem jedan teški metal ali i na hemoterapeutike i antibiotike. Povećana kretanja ljudi iz jedne zemlje u drugu i sa jednog kontinenta na drugi imaju ogroman značaj u širenju multirezistentnih bakterija.

Pronađena je uzročna veza između povećanog korišćenja antibiotika kako u humanoj i u veterinarskoj medicini, kod domaćih i divljih životinja, industrijom proizvodnje tako i povećanoj rasprostranjenosti bakterija otpornih na antibiotike. Iako su se prve sumnje o otpornosti bakterija na antibiotike javile u bolnicama, gde su se antibiotici i najviše koristili važnost AMR prepoznata je već 1969. godine i u humanoj i u veterinarskoj medicini kao što je navedeno u Swan izveštaju. Dalja istraživanja su pokazala da je poreklo i širenje AMR, u stvari, vrlo kompleksan problem.

Zbog preterane upotrebe i zloupotrebe antibiotika u različitim oblastima akvakulture rezistentne i multirezistente bakterije se prenose iz ribnjačkih u otvorene vode.

Termin „superbakterije” odnosi se na bakterije koje izazivaju povećan morbiditet i mortalitet zbog višestrukih mutacija koje dovode do visokog nivoa otpornosti na mnoge klase antibiotika posebno preporučenih za njihovo lečenje. Terapijske opcije kod infekcija ovim bakterijama su smanjene, i vreme bolničkog lečenja je produženo i dosta skuplje. U nekim slučajevima, superrezistentni sojevi takođe imaju veću virulenciju i veću moć prenošenja. Realno, otpornost bakterija na antibiotike se može smatrati faktorom virulencije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Rezistencija bakterija na antibiotike

Dve najznačajnije definicije rezistencije bakterija na antibiotike baziraju se na mikrobiološkim ispitivanjima (*in vitro* rezistencija) i kliničkim ispitivanjima (*in vivo* rezistencija).

Na osnovu mikrobiološke definicije, soj je rezistentan na antibiotik ukoliko se umnožava u prisustvu koncentracije tog antibiotika koja je veća od koncentracije istog antibiotika koja inhibira porast drugih sojeva filogenetski srodne vrste (Aarestrup, 2006). Stoga, rezistencija nije osobina koja se može i sme proučavati na samo jednom bakterijskom soju, već je neophodno upoređivati ponašanje najmanje dva i više sojeva bakterija pod istim uslovima kultivisanja. S obzirom na to da se stepen osetljivosti bakterija na antibiotike kod različitih vrsta bakterija značajno razlikuje, pojava rezistencije može se ispitivati samo unutar jednog roda i vrste.

Prema kliničkoj definiciji, soj bakterije je rezistentan ako preživi i neometano se umnožava u toku terapije određenim antibiotikom (Miriagou, 2006).

Kvantitativna ispitivanja pojave rezistencije bakterija na antibiotike vrše se određivanjem vrednosti MIK (minimalne inhibitorne koncentracije) za dati lek (CLSI, 2015, Mišić, 2008). Vrednost MIK je najmanja koncentracija antibiotika koja sprečava porast ispitujućeg bakterijskog soja. Na osnovu graničnih vrednosti MIK soj se kategorizuje kao osetljiv, intermedijaran ili rezistentan (CLSI, 2015). Postoje mikrobiološke granične vrednosti MIK i kliničke granične vrednosti MIK. Mikrobiološke granične vrednosti MIK baziraju se na distribuciji više vrednosti MIK za sojeve unutar jedne bakterijske vrste, a rezistencija se proglašava kada se pojavi vrednost MIK kod jednog ispitujućeg soja koja je viša u odnosu na vrednosti MIK koje su dobijene u ispitivanjima kod divljih sojeva bakterija iste vrste (CLSI, 2015, Isenberg, 2004). Ovako dobijene granične vrednosti pogodne su za monitoring rezistencije bakterija na antibiotike koji ima za cilj otkrivanje novih oblika rezistencije unutar jedne populacije bakterija kao i identifikaciju novih oblika (fenotipova) rezistencije.

Kliničke (ili farmakološke) granične vrednosti MIK određuju se ne samo na osnovu distribucije MIK-ova kod sojeva unutar iste vrste već i na osnovu *in vivo* parametara kao što su farmakokinetika i farmakodinamika antibiotika i korelacija

dobijenih graničnih vrednosti MIK sa kliničkim rezultatima lečenja (Isenberg, 2004). Određivanje kliničkih graničnih vrednosti MIK značajno je za kliničare jer na osnovu rezultata ispitivanja vrednosti MIK kliničari vrše izbor antibiotika za terapiju. Za sada, najveći uticaj u ovoj oblasti istraživanja ima CLSI (Clinical laboratory standards Institute, USA) koji na godišnjem nivou izdaje ogroman broj publikacija vezanih za ovu problematiku i na osnovu čijih rezultata se ravnaju gotovo svi evropski nacionalni komiteti kao i nacionalni komiteti za laboratorijske standarde zemalja u drugim regijama sveta.

Mnogi odlični revijalni radovi opisuju genetiku i biohemiju porekla, evolucije i mehanizama otpornosti bakterija na antibiotike koji su se pojavili u poslednjih 60 godina. Dva koja su vredna pomena su Levy i Marshall, 2004 i White i sar., 2005. Otkriće antibiotika, modeli delovanja, i mehanizmi otpornosti su bile plodne teme za istraživanja u naučnoj zajednici a u skorije vreme i u farmaceutskoj industriji. Potpuna sinteza takvih prirodnih proizvoda u laboratorijskim uslovima je teška, s obzirom da su ti mali molekuli četo ekstremno kompleksni u funkcionalnom delovanju i hiralnosti (Nikolaou i Montagnon, 2008). Antibiotik penicilin je otkriven 1928. godine, ali kompletna struktura ovog relativno jednostavnog molekula otkrivena je tek 1949. godine, rendgenskom kristalografijom u istraživanju Dorothy Hodgkin (Crowfoot i sar., 1949) i potvrđena potpunom sintezom 1959. godine (Sheehan i Henery-Logan, 1959).

Horizontalni transfer gena je imao dominantnu ulogu u evoluciji i prenosu otpornosti na β -laktamske antibiotike među entero bakterijama kako bolničkih tako i vanbolničkih infekcija. Što se tiče bolničkih (nosokomijalnih) infekcija, *Pseudomonas aeruginosa* je evoluirao od patogena koji najčešće izaziva infekcije rana od opekotina do velike nosokomijalne pretnje. U ovom slučaju, mehanizmi odgovorni za otpornost bakterija na antibiotike opet su evoluirali slučajno kada i uvođenje novih antibiotičkih derivata, narušavajući najefikasnije tretmane (kao što su β -laktami i aminoglikozidi). *Pseudomonas aeruginosa* je od velikog značaja za pacijente koji su oboleli i od cistične fibroze (Davies i Davies, 2010). Razvoj otpornosti bakterija na ovaj patogen je povezan sa dužom upotrebom antibiotika kod tih pacijenata. Trenutno, najozloglašeniya superbakterija je *Staphylococcus aureus*. Može da se raspravlja da li je to stvarno najozbiljniji mikroorganizam ili je to samo loša reputacija prekomernog izveštavanja u medijima. *Staphylococcus aureus* je vrlo usko povezan sa čovečanstvom; nalazi se kao

komensal u nosu kod 30 % populacije. Nema istorijsku reputaciju kao *M.tuberculosis*, ali poslednjih godina, ovaj multirezistentni patogen je postao glavni uzročnik bolničkih infekcija (Enright i sar., 2002). Relativno skoro, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) je „izašla“ iz bolnica i postala je glavni vanbolnički patogen, sa povećanom virulencijom i karakteristikama odgovornim za prenošenje.

Problem otpornosti bakterija na antibiotike predstavlja rastući problem javnog zdravlja zato što su infekcije bakterijama koje su otporne na antibiotike znatno teže za lečenje ali i dosta skuplje za lečenje. Posledice ovog problema su: duži ostanak u bolnici, duže odsustvovanje sa posla, smanjen kvalitet života, veća verovatnoća smrtnog ishoda zbog neadekvatne ili odložene terapije (Wilke, 2010). Zato, u cilju izračunavanja ukupnog ekonomskog tereta AMR treba imati u vidu i teret nemanja terapijskih opcija uopšte, koje bi u ekstremnim slučajevima verovatno dovele do sloma celog modernog medicinskog sistema (Pratt, 2010).

Geni zaduženi za otpornost bakterija na antibiotike mogu se razlikovati u zavisnosti od genetskog događaja/procesa koji je potreban za sticanje AMR fenotipa. Ovo uključuje gene koji su potrebni za horizontalan transfer gena i gene koji su prisutni u bakterijskom genomu i koji mogu da kodiraju AMR prateći genske mutacije ili aktivacije (Olliver i sar., 2005). Odlike AMR se razvijaju kao posledica stalne razmene i svake nove rekombinacije gena, genskih platformi i genetskih vektora. Mnogi od ovih gena nisu prevashodno geni rezistencije ali pripadaju skrivenom rezistomu, skupu gena koji mogu biti pretvoreni u AMR gene (Baquero i sar., 2009).

2.2. Tipovi rezistencije bakterija na antibiotike

Unutrašnja rezistencija ili *primarna rezistencija* je novi naziv koji je u upotrebi od 2005. godine i kojim je zamenjen nekadašnji naziv *urođena rezistencija* koji nije adekvatan i ne može se primeniti na bakterije (Aarestrup, 2006). Unutrašnja rezistencija bakterija na antibiotike posledica je strukture i funkcionalnih karakteristika vrste ili roda zahvaljujući kojoj pripadnici date vrste tj. roda tolerišu prisustvo jednog ili više antibiotika iste ili različitih klasa. Tačnije, *unutrašnja rezistencija* bi pre trebalo da se definiše kao *neosetljivost* ili *smanjena osetljivost* nekog soja na antibiotike (Aarestrup, 2006). *Neosetljivost* bakterija se javlja zbog niskog afiniteta tog antibiotika prema

ciljnom mestu delovanja kod soja ili zbog nemogućnosti da antibiotik uopšte prođe kroz ćelijski zid u unutrašnjost bakterije.

Unutrašnja rezistencija odnosno neosetljivost bakterija na antibiotike je veliki problem sa stanovišta limitiranog izbora antibiotika za lečenje nekih ozbiljnih infekcija do kojih dovode ovakvi sojevi. Tipičan primer su *Mycobacterium tuberculosis* i *Pseudomonas aeruginosa* kod kojih je izbor delotvornih antibiotika veoma sužen, a posebno je opasna stečena rezistencija kod ovih sojeva jer se još dodatno smanjuje broj preparata koji se mogu upotrebiti.

Stečena rezistencija kod bakterija je ogroman problem današnjice i predstavlja najozbiljniju medicinsku pretnju za zdravlje ljudi i životinja. Stečena rezistencija uvek je posledica promena u bakterijskom genomu do kojih može da dođe mutacijama (*endogena rezistencija*) ili horizontalnim prenošenjem tuđeg (stranog) genetičkog materijala (*egzogena rezistencija*) (Aarestrup, 2000, 2006, Mišić, 2005). Stečena rezistencija može nastati i kombinovanjem mutacija i horizontalnom razmenom gena. Endogena rezistencija ima veći značaj kod bakterija koje nikada ne primaju gene rezistencije putem horizontalnog transfera, a to je slučaj sa *Mycobacterium tuberculosis* (Cohen, 1992).

Horizontalni transfer gena rezistencije odvija se putem transdukcije, transformacije i konjugacije ali o ovim mehanizmima biće više reči u delu o plazmidima.

Krosrezistencija ili *ukrštena rezistencija* je fenomen kod koga je rezistencija na jedan antibiotik povezana sa rezistencijom i na ostale antibiotike sličnih mehanizama delovanja (Aarestrup, 2006, Cohen, 1992). Ukrštena rezistencija se može javiti kod svih pripadnika klase kojoj primenjeni antibiotik pripada (sulfonamidi), može biti limitirana samo na neke antibiotike iz iste klase kako se događa kod aminoglikozida (rezistencija na neomicin ili streptomycin ne podrazumeva i rezistenciju na amikacin), ili, što je najređa pojava, uključuje antibiotike iz različitih klasa (CLSI, 2015, Cohen, 1992).

Ukrštena rezistencija i *korezistencija* nisu iste pojave i ne treba ih mešati. *Korezistencija* je takođe oblik povezane rezistencije, ali se javlja kao posledica koegzistiranja gena rezistencije u međusobnoj blizini pri čemu svaki gen kodira rezistenciju na različite antibiotike, a oba gena se uvek prenose zajedno (Aarestrup, 2000, 2006). Tako se, zapravo, korezistencijom objašnjava neuspeh u pokušajima da se

smanji pojava rezistentnih sojeva bakterija primenom mera ograničene upotrebe antibiotika. Jer, upotreba samo jednog antibiotika, zahvaljujući korezistenciji uticaće na selekciju plazmida koji sadrži gen rezistencije za taj antibiotik, ali i sve ostale gene koji su se molekularnim rearanžiranjima zatekli na datom plazmidu, pa će se, paradoksalno, primenom samo jednog antibiotika i dalje širiti rezistencija i na mnoge druge antibiotike.

Međutim, bez obzira na vrstu antibiotika, otkriveno je da pojedini sojevi *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis i *Staphylococcus aureus* izuzetno lako i brzo mutiraju, 1000 puta brže nego drugi sojevi-pripadnici navedenih rodova (Thorrold i sar., 2007, van den Bogaard i sar., 2001, van Duijkeren i sar., 2002). Takvi izuzeci nazivaju se *hipermutatorima* a sposobnost ovih sojeva da lakše i brže mutiraju u odnosu na druge sojeve potiče od nedostatka kvalitetnog enzimskog sistema za popravku grešaka kod DNK. Zato se multirezistencija veoma lako i brzo javlja upravo kod nabrojanih vrsta.

2.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike

Biohemijska suština i složenost mehanizama rezistencije prevazilazi temu ovog istraživanja, ovde će biti samo nabrojani do sada poznati mehanizmi pomoću kojih se bakterije brane od delovanja antibiotika.

a) Enzimska inaktivacija antibiotika

Enzimska inaktivacija antibiotika je glavni mehanizam rezistencije bakterija na aminoglikozide, β -laktamske antibiotike i fenikole. Ovaj mehanizam se pored toga javlja i kod rezistencije na tetracikline i fosfomicine ali znatno ređe (Mišić, 2008). Enzimi dovode do hemijske promene unutar strukture antibiotika, a time posledično dolazi do nesposobnosti molekula antibiotika da se veže za ciljno mesto. Enzimska modifikacija se sastoji u cepanju molekula antibiotika ili u dodavanju neke hemijske grupe molekulu antibiotika. Ovaj tip rezistencije najčešće se prenosi putem plazmida i ostalih mobilnih genetičkih elemenata. Najpoznatiji od svih enzima su beta laktamaze koje cepaju β -laktamski prsten penicilina, cefalosporina i karbapenema koji nakon toga više ne mogu da se vežu za PVP (penicilin vezujuće proteine). Za rezistenciju na aminoglikozide odgovorni su enzimi N-acetiltransferaze, O-fosfotransferaze i O-nukleotidiltransferaze.

b) Modifikacija ili zamena ciljnog mesta delovanja antibiotika

Ciljno mesto delovanja može da bude modifikovano ili zamenjeno tako da se lek više ne može vezati. Ovaj mehanizam rezistencije otkriven je kod svih vrsta bakterija na sve antibiotike i hemioterapeutike (Mišić, 2005). Kod antibiotika koji se vezuju za ribosome (makrolidi, aminoglikozidi, linkozamidi i streptogramini) strukturne promene na ciljnim mestima za vezivanje najčešće se događaju metilacijom. Međutim, dva najznačajnija fenotipa rezistencije sa stanovišta kliničke terapije jesu povezana sa ovim mehanizmom a to je rezistencija *Enterococcus* vrsta na vankomicin (VRE) i rezistencija *Staphylococcus aureus* na meticilin/oksacilin (MRSA). U oba slučaja, nakon dobijanja novih gena stafilokoke i enterokoke sposobne su da proizvedu nove receptore niskog afiniteta za vezivanje sa nabrojanim antibioticima. *S.aureus* (MRSA) nakon što preko plazmida dobije gen *mecA* sposobna je da sintetiše novi tip transpeptidaza, umesto PBP2, stvaraju se PBP2A za koje se antibiotik ne može vezati.

c) Efluks pumpa

Aktivni efluks je mehanizam otkriven kako kod prokariota tako i kod eukariota. Pomoću efluks pumpe, uz značajan utrošak energije, ćelija iz sopstvene citoplazme u spoljašnju sredinu izbacuje metabolite, strane i nepotrebne komponente, toksine i lekove. Efluks pumpa je, tačnije, naziv za transmembranske proteine koji aktivnim transportom obavljaju funkciju izbacivanja. Pomoću ovog mehanizma se ne izbacuje ukupna količina antibiotika iz citoplazme već se samo smanjuje koncentracija antibiotika do tog nivoa da antibiotik ne može da ispolji efekat.

d) Redukcija prolaska molekula antibiotika u ćeliju

Spoljašnja membrana nekih vrsta bakterija je značajno manje propustljiva nego kod drugih, takav je slučaj sa *Pseudomonas aeruginosa*, a posledično tome antibiotik otežano ili nikako ne prolazi u unutrašnjost bakterije (van Delden, 2007). Ustanovljeno je da se veličina pora kod bakterija može promeniti nakon nekih mutacija, ili pore mogu čak i da nestanu u nekom procentu. Ovaj mehanizam rezistencije javlja se kod enterobakterija na beta-laktame i fluorohinolone, a posebno često se otkriva kod kliničkih sojeva *E.coli* O157:H7 (Schluter i sar., 2005). Iako je ovo takozvana „rezistencija niskog nivoa“ tj. nema velikog značaja posmatrano sa stanovišta kliničke terapije, zajedno sa drugim mehanizmima rezistencije i ovaj mehanizam doprinosi onemogućavanju lečenja ljudi i životinja.

e) Zaštita ciljnog mesta delovanja antibiotika

Ovo je novootkriveni mehanizam i opisan je 2005. godine. Otkriven je kod bakterija čije je stanište zemljište i koje su i same proizvođači antibiotika, na primer *Agrobacterium rhizogenes* (Aarestrup, 2006). Ciljno mesto delovanja antibiotika može biti zaštićeno od strane nekih proteina koji se vežu pre antibiotika. Nakon vezivanja proteini ne ometaju funkciju ciljnog mesta ali antibiotici se više ne mogu vezati. Otkriveni su ribosomalni zaštitni proteini (obeleženi kao RPPs od engleskog naziva „ribosomal protection proteins“) kod enterobakterija rezistentnih na tetracikline. Ovi RPS proteini se vezuju za ribosome i sprečavaju vezivanje tetraciklina. Međutim, ovaj tip rezistencije se javlja i kod enterobakterija rezistentnih na hinolone s tim što u slučaju hinolona nije otkriveno da li se zaštitni proteini obeleženi kao *QnrA* i *QnrB* vezuju za DNK girazu ili DNK molekule.

Najviše pažnje trenutno je posvećeno ispitivanju prisustva gena označenih kao *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* itd, koji kodiraju metilovanje ciljnih mesta za vezivanje aminoglikozida (Gonzales-Zorn i sar., 2005, Yang i sar. 2004, Yokoyama i sar., 2003). Bakterije koje su nosioci *armA* gena, uključujući i sojeve *E.coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, rezistentne su na sve postojeće aminoglikozidne antibiotike, uključujući i amikacin što je predmet ogromne zabrinutosti kliničara. Istraživanja su usmerena na to da se ustanovi kako su uopšte arm geni iz zemljišta tj. bakterija čije je stanište zemlja dospeli do kliničkih sojeva bakterija u bolnicama i zašto tek sada, u poslednjoj deceniji.

f) Hvatanje antibiotika u zamku i titracija antibiotika

Ovo je takođe novoopisani mehanizam rezistencije. Naime, bakterije su sposobne da u trenutku kontakta sa antibiotikom radi odbrane počnu da proizvode molekule koji za samu bakteriju nemaju značaja ali za njih se antibiotici vezuju sa visokim afinitetom. Time se praktično „skreće pažnja“ antibiotika sa pravog ciljnog mesta vezivanja na lažna ciljna mesta. Ovo se u stranoj literaturi opisuje kao „zamka za antibiotik“ (Aarestrup, 2006). Ovaj mehanizam nipošto ne treba mešati sa modifikacijom ciljnog mesta delovanja jer kod tog mehanizma molekuli antibiotika ostaju slobodni (nevezani).

Takođe, bakterija je sposobna da povećanom produkcijom poveća broj molekula koji su pravo ciljno mesto delovanja antibiotika i time praktično smanji koncentraciju slobodnih molekula antibiotika što se naziva „titracija antibiotika“ (Aarestrup, 2006).

Ovaj mehanizam je opisan kod rezistencije na sulfonamide i za to su odgovorne mutacije na hromozomima. Takođe je isti mehanizam opisan kod rezistencije *S.aureus* na vankomicin. U ovom slučaju *S.aureus* pri kontaktu sa vankomicinom započinje hiperprodukciju peptidoglikana i dolazi do zadebljanja ćelijskog zida, koji je pri tome slabo porozan. Molekuli vankomicina se „zaglave“ u odebljalom ćelijskom zidu stafilokoka i praktično se sav vankomicin potroši na vezivanje sa ciljnim mestima u spoljašnjim slojevima peptidoglikana dok dublji slojevi ostaju slobodni, a bakterija ostaje praktično zaštićena od delovanja antibiotika.

g) Kombinovani mehanizmi rezistencije

Nekoliko različitih gena rezistencije koji kodiraju različite mehanizme rezistencije na isti antibiotik može se naći u genomu jednog soja. Takav soj ispoljava rezistenciju na jedan antibiotik primenom različitih mehanizama. Kombinovanje mehanizama ima velikog značaja u kliničkoj terapiji jer se značajno, duplo ili trostruko povećavaju vrednosti MIK za taj antibiotik.

Kada dva istovremena mehanizma rezistencije na isti antibiotik doprinesu da vrednost MIK za taj antibiotik bude suma pojedinačnih vrednosti MIK za svaki mehanizam posebno, onda se govori o *aditivnoj rezistenciji*. Na primer, *S.aureus* može nositi gen *tetK* koji kodira mehanizam za aktivni efluks tetraciklina pri čemu je MIK tetraciklina za taj soj 128 µg/ml. Sa druge strane soj *S.aureus* može da nosi i gene *tetM* i *tetO* koji kodiraju mehanizam za stvaranje zaštitnih proteina, pri čemu i takav soj ima vrednost MIK za tetraciklin od 128 µg/ml. Kod soja *S.aureus* koji poseduje sve navedene gene, a time i dva mehanizma rezistencije na tetraciklin, MIK za ovaj antibiotik iznosiće 256 µg/ml i više.

Sa druge strane postoji i *sinergistička rezistencija*, a to je pojava kada se u istom genomu jednog soja nalaze geni koji kodiraju različite mehanizme rezistencije na različite antibiotike čime se suma antibiotika na koje je soj rezistentan povećava (Cain i sar., 2003).

2.4. Uloga mobilnih genetičkih elemenata u širenju rezistencije

Kako je već rečeno, horizontalnim transferom geni rezistencije se mogu proširiti između sojeva bakterija pripadnika istih rodova, ali i između potpuno različitih vrsta, pa čak i između prokariota i eukariota. Geni rezistencije se mogu prenositi putem mobilnih

genetičkih elemenata: plazmida, transpozona, integrona, genskih kaseti i takozvanih samoprenosivih konjugativnih genskih elemenata (genomska ostrva).

O plazmidima i svim drugim mobilnim genetičkim elementima kao i mehanizmima transformacije, transdukcije i konjugacije među bakterijama biće više reči u narednom poglavlju.

2.5. Plazmidi i njihov značaj u širenju gena rezistencije kod bakterija

2.5.1. Definicija plazmida i njihov značaj u evoluciji

Hromozomi kod bakterija se, najjednostavnije, mogu opisati kao nakupine ili takozvana „skladišta“ molekula DNK sa genima neophodnim za odvijanje esencijalnih životnih funkcija bakterijske ćelije (Quinn i sar., 2002, Summers, 1996). U hromozomalnom genomu smeštene su informacije za rast i deobu, odnosno, za sve funkcije metabolizma i razmnožavanja. Hromozomi nose gene sa informacijama za nepromenljive osobine bakterija koje se kao takve ne menjaju vekovima, a koje se tiču samo produžavanja vrste (uslovi za deobu, generacijsko vreme, veličina bakterije, itd). Za hromosome kod bakterija se kaže da imaju takozvani „skučeni,“ ili „skromni“ genom, bez velikog broja informacija. Međutim, za promene u postojećim fenotipskim osobinama koje se javljaju kod bakterija unutar iste vrste, ili unutar iste populacije, kao i za pojavu potpuno novih fenotipskih osobina koje se dešavaju prilikom promena uslova sredine, odgovorni su plazmidi (Srinivasan i sar., 2007, Summers, 1996). Plazmidi su citoplazmatske DNK, ili kako ih neki autori nazivaju „nakupine gena u citoplazmi“ veličine od 300 bp do 2400 kb koji iskorišćavaju metaboličke funkcije ćelije domaćina za sopstveni metabolizam i deobu, ali su uprkos tome fizički potpuno odvojeni i nezavisni od hromozoma (Summers, 1996). Genetska nezavisnost ili takozvana „samostalnost“ plazmida ima centralnu ulogu u evoluciji bakterija i njihovom opstajanju kroz vekove s obzirom da plazmidi donose bakterijama veliko i spremno pakovanje gena kojima se osvežava i proširuje broj informacija i funkcija u ukupnom bakterijskom genomu. Tako, prema definiciji, hromozomi obezbeđuju genetičku stabilnost kod bakterija dok plazmidi omogućavaju brze, gotovo trenutne promene kada za to postoje potrebe (Bartoloni i sar., 2006, Summers, 1996).

2.5.2. Otkriće plazmida, njihova struktura i klasifikacija

Zasluge za otkriće i imenovanje plazmida dobio je molekularni biolog Joshua Lederberg. On je u svom radu objavljenom u časopisu *Physiological Reviews*, 32:403-430, 1952. godine predložio nekoliko naziva za ove novootkrivene ekstrahromozomalne genetske determinante: pangeni, plastogeni, hondriogeni, citogeni, plazmidi i provirusi. Odabran je naziv „plazmid“ kojim se označavaju sve nehromozomalne DNK. Joshua Lederberg je sa svojim saradnicima u istom periodu otkrio i transdukciju (1951), a pre toga i konjugaciju (1946) kao fenomene pomoću kojih se genetičke informacije horizontalno prenose među bakterijama. Međutim, tada nije bilo poznato da su zapravo F faktori bili same plazmidne DNK. Do tog otkrića došli su Marmur i saradnici tek 1961. godine tako što su u gradijentu gustine cezijum-hlorida uspešno razdvojili hromozomalnu DNK od plazmidne DNK, a eksperimentima sa izdvojenim plazmidima dokazali su da se konjugacijom prenose upravo sami plazmidi. Potrebno je bilo da prođe još nekoliko godina opsežnih istraživanja dok nije dokazano da se geni koji kodiraju proces konjugacije nalaze baš na plazmidima tada nazvanim konjugativni plazmidi, a koji se i sami prenose u ćeliju recipijenta tokom konjugacije koju kodiraju. Za izuzetan doprinos nauci Lederberg-u je dodeljena Nobelova nagrada 1958. godine. Sada se zna da plazmidi mogu da nose i gene rezistencije na antibiotike.

Klasifikacija plazmida. Tokom prvih godina nakon njihovog otkrića, plazmidi su bili klasifikovani na osnovu veoma različitih parametara: plazmidi koji nose gene rezistencije (R plazmidi), plazmidi koji su odgovorni za proizvodnju bakteriocina, plazmidi koji kodiraju proizvodnju pila, itd. Međutim, nijedna od navedenih podela nije bila odgovarajuća, posebno nakon otkrića nekonjugativnih plazmida koji nisu imali sposobnost konjugacije ali mogli su nositi gene rezistencije ili gene za proizvodnju bakteriocina. Najsvieobuhvatnija podela plazmida izvršena je na osnovu uslova i načina njihove replikacije i to na kompatibilne i inkompatibilne plazmide.

Inkompatibilnost plazmida definiše se kao nemogućost postojanja ili „koegzistiranja“ dva plazmida u istoj ćelijskoj liniji (Summers, 1996). Tako, nakon deobe ćelije koja sadrži inkompatibilne plazmide A i B, nastaju ćelije ćerke koje sadrže samo plazmid A ili samo plazmid B. Najznačajniji uzrok inkompatibilnosti je ukrštanje puteva replikacije inkompatibilnih plazmida ili ukrštanje sistema particije (preraspodele) plazmida.

Kod ukrštanja puteva replikacije plazmida dolazi do uzajamnog ometanja procesa kontrole replikacije plazmida zbog čega takvi plazmidi ne mogu da koegzistiraju u istoj ćeliji.

Bergquist i saradnici (1987) opisali su i metodu za ispitivanje kompatibilnosti plazmida u uslovima *in vitro*. Transformacijom ili konjugacijom izvrši se ubacivanje plazmida A u bakterijsku ćeliju za koju se pouzdano zna da sadrži plazmid B. Ćelije transformanti ili transkonjuganti kultivišu se na podlogama nakon čega se ispituju na prisustvo plazmida B. Ako u ćelijama nema plazmida B onda su plazmidi A i B inkompatibilni. Ako se pojave ćelije samo sa plazmidom A i ćelije samo sa plazmidom B, ispitivanja se moraju ponoviti, kako na neselektivnim, tako i na selektivnim podlogama kako bi se preciznije ispitaio fenomen segregacije. Naime, nekada se događa da plazmidi nose po dva sistema za sopstvenu replikaciju što dodatno čini složenijim problem kompatibilnosti plazmida. Pored toga, treba naglasiti da se segregacija (gubitak) plazmida u određenom, niskom procentu događa uvek, bez obzira na kompatibilnost plazmida.

Interesantno je da se perzistencija plazmida obezbeđuje ne samo vertikalnim prenošenjem prilikom deobe ćelije domaćina, nego i horizontalno, transformacijom, transdukcijom i konjugacijom (Watanabe, 1963). Tako da, ako se pojave ćelijske linije koje su izgubile plazmid, velika je verovatnoća da će jednim od navedenih mehanizama one ponovo primiti isti plazmid. Time se obezbeđuje perzistiranje plazmida u prirodi.

Genetska struktura plazmida je nestalna. Rekombinacijama i transpozicijama konstantno se dešavaju pregrupisavanja gena unutar jednog plazmida pri čemu se beskonačno proizvode nove genetske kombinacije. U dodiru sa insercionim sekvencama, transpozonomima, integronima i genskim kasetama, delovima drugih plazmida ili delovima hromozomalne DNK, dolazi do obimnih rearanžiranja strukture plazmida uključujući i njihovo pripajanje drugim plazmidima ili integrisanje u hromozomalne DNK. Ova strukturna nestabilnost unutar plazmida veoma otežava „individualno“ proučavanje plazmida, jer svaki put nakon ponovnog osvežavanja jednog istog bakterijskog soja, može se izolovati različit plazmid.

Osim toga, zahvaljujući čestom i iznenadnom gubitku plazmida iz neke ćelijske linije i čestog unutrašnjeg rearanžiranja genoma, plazmidi imaju i osobinu nestabilnosti. Nestabilnost je karakteristika onih plazmida koji su u ćeliji domaćina prisutni u malom

broju kopija i koji se preraspodeljuju u ćelije ćerke mehanizmom nasumične particije. Ogroman broj faktora utiče na nestabilnost plazmida. Svi ti faktori tiču se kako vrste gena na samim plazmidima, tako i fiziologije ćelije domaćina. Obe osobine nepredvidljivosti i nestabilnosti presudne su za to da su rezultati kod proučavanja prisustva takozvanih „divljih plazmida“ kod kliničkih sojeva bakterija uvek neizvesni i teški za tumačenje i analizu. Iako se plazmidi proučavaju već 45 godina, nepredvidljivost plazmida i njihova nestabilnost su osobine zahvaljujući kojima se o plazmidima još uvek veoma malo zna. Postoje oblasti molekularne genetike koje se bave isključivo proučavanjem nestabilnosti plazmida i matematičkim modelovanjem na osnovu koga se može predvideti ova osobina radi sprečavanja neželjenih gubitaka plazmida u raznim istraživanjima.

Sa druge strane, napredak tehnika molekularne biologije doprineo je mogućnostima genetičkog mapiranja DNK tj. sekvencioniranja genoma svih živih bića pa i plazmida, insercionih sekvenci, transpozona i genskih kaset. Tako je postalo moguće da se na izolovanom plazmidu, nakon sekvencioniranja i takozvanog „opisivanja plazmida“ ustanovi koliko taj plazmid sadrži baznih parova nukleotida, procenat zastupljenosti pojedinačnih baza, ali i prisustvo transpozona, insercionih sekvenci i genskih kaset u ispitujućim plazmidima. Nakon završenog opisivanja, plazmidi se imenuju, odnosno označe šifrom i održavaju kao takvi u laboratorijskim sojevima bakterija radi daljih ispitivanja.

2.5.3. Širenje plazmida i gena rezistencije u prirodi

Kako je već napomenuto, osim vertikalnim prenošenjem sa ćelije na ćeliju prilikom deobe, plazmidi sa genima rezistencije, kao i drugi mobilni genetički elementi mogu se prenositi i horizontalnim putem i to između organizama različitih vrsta, porekla i rodova. Horizontalni transfer gena naj češće i najlakše se događa između bakterija iste vrste, odnosno pripadnika istih rodova. Međutim, otkriveno je da se plazmidi mogu prenositi i sa bakterija na kvasce, plesni, pa čak i biljke, i obratno. Najopasnija je mogućnost razmene genetičkog materijala između mikroorganizama koji su primenom metoda genetičkog inženjeringa genetički izmenjeni *in vitro* i divljih mikroorganizama u prirodi.

a) Transdukcija

Transdukcija je opisana kod dvadesetak rodova bakterija. Kako bakterofagi imaju ograničenu patogenost samo za neke rodove bakterija, ovaj način horizontalnog transfera gena ima manji značaj nego transformacija.

b) Transformacija

Transformacija je opisana prvi put još 1928 godine. Ovaj mehanizam podrazumeva ulazak strane (egzogene) DNK u ćeliju primaoca i ekspresiju novoprimitljenih gena kod ćelije primaoca. Donori DNK su najčešće lizirane-mrtve bakterije ili bakteriofagi (Quinn, 2002, Summers, 1996 Watanabe, 1963).

Ćelija primaoc se naziva kompetentna ćelija. Osobina kompetencije se definiše kao potencijal ćelije da bude transformisana. Do skoro se smatralo da u prirodnim uslovima osobinu kompetencije ima mali broj bakterijskih vrsta, na primer *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas stutzeri*, itd.

Međutim, danas je poznato da čak 40 vrsta bakterija ima sposobnost transformacije u prirodnim uslovima, uključujući čak i *Campylobacter* vrste. Prirodne kompetentne ćelije proizvode DNK- vezujuće receptore na površini svojih membrana i tako vezuju egzogene DNK. Kod *Streptococcus* i *Bacillus* vrsta ne postoji razlika u afinitetima prema egzogenim DNK molekulima, odnosno, ove vrste vezuju i primaju sve strane DNK bez obzira na poreklo.

Za razliku od toga, *Haemophilus* pokazuje afinitet samo prema DNK molekulima poreklom od pripadnika istog roda. Transformacija se u prirodnim uslovima odigrava retko s obzirom na to da se navedene vrste bakterija moraju zadesiti u gotovo savršenim uslovima sredine (odgovarajuća pH, koncentracija jona kalcijuma, magnezijuma, odsustvo endonukleaza koje razlažu egzogene DNK, itd). Uprkos tome, smatra se da je prirodna transformacija od velike važnosti za širenje gena rezistencije. Na primer, dokazano je da su prvi penicilin-rezistentni sojevi *Streptococcus pneumoniae* nastali prirodnom transformacijom.

Transformacija, kao *in vitro* metoda, zbog lakoće izvođenja jedna je od najpopularnijih i najčešće korišćenih metoda u molekularnoj biologiji i kliničkoj mikrobiologiji, a obavlja se u svrhu kloniranja, sekvencioniranja i ekspresije određenih gena.

Kompetentne ćelije za potrebe izvođenja transformacije *in vitro* pripremaju se takođe u uslovima *in vitro* ili se jednostavno mogu kupiti od proizvođača već pripremljene. U najširoj upotrebi su kompetentni sojevi *E.coli*. Sve kompetentne ćelije *E.coli* koje se danas mogu naći na tržištu, potiču od jednog zajedničkog pretka, *E.coli* soja K12 koji je izolovan još 1922. godine. Soj K12 je laktoza negativan (mutiran) a svi sojevi koji su danas u upotrebi dobijeni su naknadnim genetičkim modifikacijama *E.coli* soja K12.

Postoje dva tipa kompetentnih sojeva *E.coli*: hemijski kompetentni sojevi *E.coli* i elektrokompetentni sojevi *E.coli*.

Hemijski kompetentne ćelije *E.coli* dobijaju se tretiranjem ćelija puferima koji sadrže kalcijum-hlorid (CaCl_2) koji do određenog nivoa oštećuje ćelijsku membranu tretiranih bakterija, tako što dovodi do stvaranja „šupljina“ kroz koje kasnije u procesu transformacije može da prođe plazmid ili druga egzogena DNK. Najčešće se koristi ovaj tip kompetentnih ćelija jer način njihovog dobijanja, odnosno pripremanja nije skup ni dugotrajan i ne zahteva posebnu opremu za rad.

Suprotno od toga, za dobijanje elektrokompetentnih sojeva *E.coli* potrebna je skupa oprema jer se u rastvoru pufera mora obezbediti pulsirajuće polje električne struje koje će oštetiti ćelijsku membranu kod *E.coli*, tako da kroz nju može da prođe egzogena DNK.

Efikasnost *in vitro* transformacije znatno je veća kada se koriste elektrokompetentni sojevi *E.coli* nego hemijski kompetentni sojevi *E.coli*. Uprkos tome, zbog skupoće i komplikovanosti procesa, elektrokompetentne ćelije se retko koriste.

Kao što je već rečeno, kompetentne ćelije mogu da služe za propagaciju (proizvodnju, umnožavanje) unetih plazmida posle transformacije ili za ekspresiju unetog (kloniranog) gena. Plazmidi mogu biti divlji, poreklom iz divljih (kliničkih) sojeva bakterija ili pak mogu da budu gotovi (kupovni), kada služe kao vektori ili kao vektori u koje je unet gen koji se ispituje. U skladu sa zadatkom i karakteristikama plazmida bira se i soj u koji će da se ubaci plazmid i tako transformiše bakterija. Soj *E.coli* DH5 α se vrlo često koristi upravo za propagaciju plazmida. Tako se dobija praktično nepresušni izvor tog plazmida koji se po potrebi može ponovo izolovati i proučavati. Oznake genotipa kompetentnih ćelija su bitne iz tog razloga, jer nam

pokazuju da li će plazmid ostati nepromenjen u transformisanoj bakteriji ili postoji opasnost da ga transformant izmeni.

Za propagaciju plazmida najčešće su u upotrebi sledeći sojevi kompetentnih ćelija: *E.coli* 101 (DH5 α), *E.coli* JM109, *E.coli* JM 107, *E.coli* Blue (XL1-Blue), *E.coli* BL21 DE3, itd. Postoji ogroman broj drugih kupovnih kompetentnih ćelija koje se koriste za druge svrhe, na primer za ekspresiju gena.

Kompetentne ćelije se čuvaju na minus 70° C. Njihov kvalitet se proverava upotrebom takozvanog „minimalnog medijuma“ u kome očuvane kompetentne ćelije dobrog kvaliteta ne mogu da se umnožavaju, tj. zasejani medijum mora da ostane bez porasta. Minimalni medijum je praktično rastvor soli, bez hranljivih materija, a jedini izvor atoma ugljenika je glukoza. Sve kompetentne ćelije su mutanti koji su nesposobni da iskoriste elemente iz minimalnog medijuma, za razliku od „običnih“ bakterija koje sve mikroelemente i makroelemente iz minimalnog medijuma, uključujući i C-atome iz glukoze mogu da iskoriste za sintezu neophodnih materija za sopstveni rast i deobu.

Zato se fenotipske i genotipske oznake kompetentnih ćelija moraju protumačiti i na osnovu toga modifikovati minimalni medijum dodavanjem supstancija koje upotrebljeni soj ne proizvodi. Na primer, u ovom ispitivanju minimalnom medijumu dodavani su glutamin i tiamin kako bi kompetentne ćelije *E.coli* DH5 α □□ mogle da se umnožavaju.

Ukoliko kompetentne ćelije porastu u nemodifikovanom minimalnom medijumu, znači da su iz okoline tj. okruženja primile nepoželjan plazmid ili druge oblike DNK, odnosno mutirale i praktično su neupotrebljive. Tačnije, znači da nisu čuvane na adekvatan način.

Za uspešnu *in vitro* transformaciju, od presudne su važnosti sledeći faktori:

- Oblik DNK.
- Količina DNK.
- Izvor DNK.
- Prisutne nečistoće kod DNK.
- Način čuvanja kompetentnih ćelija i njihovo stanje upotrebljivosti.

Oblik DNK. Transformacija kompetentnih *E.coli* podjednako je uspešna kako sa suprspiralizovanim, tako i sa relaksiranim oblicima DNK. Nasuprot tome, efikasnost

transformacije koja se izvodi sa linearnim molekulima DNK jako je niska, manje od 1 % u odnosu na efikasnost sa superspiralizovanom DNK.

Količina DNK. Dodavanje veće količine DNK tokom izvođenja transformacije *in vitro* ne dovodi obavezno i do povećanja efikasnosti transformacije, odnosno do povećanja broja uspešno transformisanih kompetentnih ćelija *E.coli*. Naime, i kada je transformacija najefikasnija, transformisan je samo određen broj ćelija, ne sve. Povećanje količine DNK nema efekta. Preporučljiva količina DNK je oko 100 ng.

Nečistoće kod DNK. Donor DNK ne sme da sadrži fenol, alkohol, polietilenglikol, deterdžente i DNK vezujuće proteine ni u najmanjem procentu. Problem je što neki rastvori koji se koriste u transformaciji *in vitro* sadrže neke od ovih supstancija koje snažno inhibiraju sam proces transformacije i smanjuju njenu efikasnost. Rastvor u kome se nalazi izolovana DNK ne sme da sadrži veliku količinu soli jer u tom slučaju dolazi do prskanja kompetentnih ćelija.

Način čuvanja kompetentnih ćelija i njihovo stanje upotrebljivosti. Kako je već rečeno, kompetentne ćelije se čuvaju na minus 70°C. Pre upotrebe ćelije se tope na ledu tokom 5 do 10 minuta. Svako centrifugiranje odvija se na najviše 4°C. Ćelije smeju ostati na temperaturi leda do 1 h, nakon toga se smanjuje mogućnost da budu transformisane.

Ćelije ne smeju da se tope u vodenom kupatilu. Ukoliko ostanu na sobnoj temperaturi 1 h i duže, ćelije ne treba upotrebljavati. Ćelije se ne smeju mućkati, vorteksirati ili pipetirati, sa njima se postupa nežno laganim tupkanjem prstima po površini endorf-kivete. Netransformisane kompetentne ćelije ne smeju da porastu na podlogama sa antibioticima. Transformisane kompetentne ćelije bi morale da porastu na podlogama sa antibioticima ako DNK koju su primile sadrži gene rezistencije na taj antibiotik.

c) Konjugacija

Konjugacija je proces tokom koga se vrši transfer DNK između dve bakterije pri čemu se stvara međućelijski kontakt između donora i recipijenta (Summers, 1996). Nukleinska kiselina koja se prenosi sa ćelije na ćeliju nikada ne napušta unutrašnjost ćelije, odnosno ostaje zaštićena od spoljašnje sredine i delovanja ekstracelularnih nukleaza, kao i teških metala koji je mogu degradirati. Ovaj proces kodiraju geni na konjugativnim plazmidima koji zapravo nose gene za kodiranje procesa stvaranja pila

pomoću kojih se omogućuje prenos DNK. Postoje dva tipa pila, dugački pili dužine do 1 μm i kratki pili dužine do 0,1 μm . Iako postoje plazmidi koji kodiraju obe vrste pila, u najvećem broju slučajeva jedan konjugativni plazmid nosi informacije za samo jedan tip pila (Summers, 1996). Dugački pili do 1 μm obezbeđuju uspešnu konjugaciju kako na površini čvrstih podloga, tako i u tečnim medijumima. Kratki pili dužine 0,1 μm obezbeđuju efikasnu konjugaciju samo na površini čvrstih podloga dok je efikasnost konjugacije u tečnim medijumima veoma niska. Konjugacijom se osim plazmida mogu preneti i delovi hromozoma pa čak i celi hromozomi. Ovaj proces je veoma složen. U regulaciji ovog procesa učestvuje izuzetno veliki broj regulacionih mehanizama koji se pokreću preko genoma na samim plazmidima. Primećeno je da različite grupe plazmida imaju različite mehanizme konjugacije. Najveće iznenađenje bilo je otkriće da za uspešnu konjugaciju nije od naročite važnosti da li su donor i recipijent pripadnici istog roda. U naučnoj literaturi za plazmide koji mogu da se konjugacijom prenose sa donora-pripadnika jednog roda na recipijenta-pripadnika drugog roda kaže se da su *pobrkani* ili *raznorodni plazmidi*. Mali plazmidi veličine do 12-13 kb nemaju gene koji kodiraju konjugaciju i stoga su mali plazmidi uglavnom nekonjugativni, ili kako se još nazivaju nemobilni tj. neprenosivi plazmidi. Međutim i nekonjugativni plazmidi mogu se preneti konjugacijom u ćelije recipijente i to tako što se privremeno, samo za potrebe konjugacije mogu spojiti sa konjugativnim plazmidom pri čemu se nekonjugativni plazmid u ovom slučaju naziva *pasivni participant*. Ovaj fenomen se zove *kondukcija plazmida*, a nekonjugativni plazmid se, nakon konjugacionog transfera razdvaja od konjugativnog plazmida u ćeliji recipijentu.

Za razliku od konjugacije između gram-negativnih bakterija koja se odvija uvek posredstvom pila, konjugacija između gram-pozitivnih bakterija se odvija drugim mehanizmima, bez učešća pila. Do sada je konjugacija iz grupe gram pozitivnih bakterija otkrivena kod *Enterococcus*, *Streptomyces* i *Staphylococcus* vrsta. Kod sva tri roda bakterija konjugacija se odvija putem potpuno različitih mehanizama.

Pored svega navedenog, otkriveno je da proces konjugacije mogu da kodiraju i drugi mobilni genetički elementi, tj. konjugacija nije strogo vezana za plazmide.

2.6. Značaj ostalih mobilnih genetičkih elemenata u širenju rezistencije

Transpozoni su molekuli DNK koji ne poseduju gene za sopstvenu replikaciju (Aarestrup, 2006, Summers, 1996). Da bi se održali i replicirali, moraju da se integrišu u hromozomalne ili plazmidne DNK. Transpozoni mogu da budu veoma različite veličine i strukturnih osobina. Najmanji transpozoni nazivaju se *insercione sekvence*. Svaki transpozon u svojoj strukturi poseduje gen za enzim transpozazu koji mu omogućuje integrisanje u veći genom, kao i sopstveno isecanje (izlazak) iz genoma. Gene rezistencije uglavnom nose veliki transpozoni koji, slično plazmidima mogu da budu konjugativni i nekonjugativni.

Genske kasete su veoma mali mobilni genetički elementi veličine do 2 kb. Sadrže samo rekombinativni region i jedan jedini gen koji je obično gen rezistencije. Genske kasete nemaju sposobnost replikacije ni transpozicije i obično su deo integrona.

Integrone nisu mobilni genetički elementi, ali se često nalaze na konjugativnim plazmidima ili transpozonima i stoga su značajni. Za integrone se kaže da su „prirodni sistem za genetički inženjering“ jer kad se nađu pored neaktivnih gena, sposobni su da ih konvertuju u aktivne gene, što je posebno značajno za gene rezistencije. Svrstani su u klase 1,2 i 3.

Genska ili *genomska ostrva* su velike nakupine gena različitog porekla sa hromozoma, plazmida, transpozona, bakteriofaga itd. Zbog raznovrsnog porekla za njih se kaže i da su *mozaični geni*. Nose veoma veliki broj gena rezistencije, mogu da se šire konjugativnim transferom, integracijom u hromosome i isecanjem iz hromozoma pri čemu sa sobom povuku još neke gene. Kod čuvene *S. Typhimurum* soja DT 104 otkriveno je genomsko ostrvo veličine 41 kb označeno kao SG11 koje je kasnije izolovano i identifikovano i kod drugih serotipova salmonela, a koje je bilo odgovorno za rezistenciju na 7 antibiotika.

2.7. Rezistencija na antibiotike kod sojeva iz rodova *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* i *Aeromonas* poreklom od riba

Pripadnici roda *Pseudomonas* su ubikvitarne bakterije iz okruženja (Jenesen i sar. 2004) a najvažnija vrsta koja pripada ovom rodu je *Pseudomonas aeruginosa* dobro poznati oportunistički patogen ljudi (Lang i sar., 2004). U akvakulturi, osim *P.aeruginosa*, važnu ulogu kao oportunistički patogeni imaju *P. fluorescens* i *P. putida*

(Altinok i sar. 2006). *P. aeruginosa* ispoljava unutrašnju (intrinzičnu) rezistenciju na različite antibiotike (ampicilin, amoksicilin-klavulanat, ampicilin-sulbaktam, cefazolin, cefalotin, cefaleksin, cefadroksil, cefotaksime, ceftriaksone, ertapenem, hloramfenikol, kanamicin, neomicin, trimetoprim, sulfamethoksazol sa trimetoprimom, tetraciklin i tige ciklin-EUCAST 2015) a pored toga, ima i sposobnost da obezbeđuje široki spektar gena rezistencije na antibiotike preko plazmida i integrona (Holmes i sar. 2003).

U Australiji je prijavljeno je da *Pseudomonas* sojevi poreklom od riba sa ribnjaka nose gene za integrone i efluks pumpe iako u vreme tog istraživanja nijedan antibiotik nije bio registrovan za upotrebu u akvakulturi (Ndi i Barton 2012).

Među *Pseudomonas* vrstama izolovanim iz morske vode česta je rezistencija na hloramfenikol (Dang i sar. 2008).

Ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod bakterija izolovanih od riba značajno je kompleksnije u odnosu na ista ispitivanja kod bakterija izolovanih od ljudi i domaćih životinja. Riba u svom organizmu nose bakterije koje su intrinzično rezistentne na veliki broj antibiotika (*Stenotrophomonas*) i stoga nemaju velikog značaja u ispitivanjima većine mehanizama rezistencije. Nije poznato kakav je i koliki je značaj u širenju gena rezistencije na antibiotike kod vrsta *Flavobacterium*, *Brevundimonas*, *Plesiomonas*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Rahnella*, *Raoultella*, i *Chromobacter* koje su sastavni deo mikrobioma kože i creva riba. Mnoge nabrojane vrste, genetski su srodne i nekada su pripadale istim rodovima, a to je razlog njihove otežane diferencijacije, naročito primenom klasičnih metoda. Većina vrsta bakterija iz organizma riba za svoj rast traži niže temperature (oko 22°C-25°C) u odnosu na preporučene temperature inkubacije u disk difuzionoj i mikrodilucionoj metodi ili u E testu (35°C -37°C, CLSI, EUCAST), zbog čega nije poznato da li su dobijeni rezultati validni ukoliko se ispitivanja osetljivosti na antibiotike vrše na temperaturama nižim od preporučenih. EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) je 2011. godine izdao dokument pod nazivom „EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing“ koji služi kao osnovni vodič za razlikovanje intrinzične rezistencije od stečene rezistencije kod raznih vrsta bakterija. U tom dokumentu nabrojan je samo mali broj vrsta bakterija koje se mogu naći kod riba, to su pripadnici rodova *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* i *Enterobacter*. Za *Aeromonas* dati su podaci o intrinzičnoj rezistenciji u dokumentu koji su zajednički izdali EUCAST i

francusko udruženje mikrobiologa. Za gotovo sve druge vrste bakterija koje žive u organizmu riba, uključujući *Vibrio*, nema podataka o tome na koje antibiotike su intrinzično rezistentne, a koja se rezistencija može smatrati stečenom, dakle bitnom za problem širenja gena rezistencije u prirodi.

Nalaz rezistencije na karbapeneme, aminoglikozide i neke cefalosporine (cefepim, ceftazidim i cefotaksim) kod *Pseudomonas* vrsta izolovanih od riba ima veliki epidemiološki značaj.

Slično ostalim vrstama bakterija i *Pseudomonas* vrste sposobne su da horizontalnim transferom gena rezistencije ili mutacijama postanu rezistentne na antibiotike koji obično pokazuju snažnu aktivnost protiv ovih bakterija. Da bi neki soj *Pseudomonas aeruginosa* bio proglašen multirezistentnim na antibiotike, potrebno je da pokaže rezistenciju na najmanje 3 ili više takozvanih „antipseudomonasnih“ antibiotika, a to su: gentamicin, amikacin, piperacilin, piperacilin sa tazobaktamom, tikarcilin, tikarcilin sa klavulanskom kiselinom, imipenem, meropenem, ciprofloksacin, enrofloksacin, aztreonam, ceftazidim, cefepim i nafcilin. Osim gentamicina i enrofloksacina, u većini zemalja, kao i u našoj zemlji, ostali nabrojani antibiotici uopšte nisu registrovani za upotrebu u veterini. Eventualno su u pojedinim zemljama registrovani ciprofloksacin i amikacin, ali za upotrebu kod velikih životinja. Stoga su veterinari veoma često primorani da primenjuju preparate iz humane medicine kako bi izlečili svoje pacijente od infekcija izazvanih navedenom bakterijskom vrstom.

Za razliku od publikacija vezanih za humanu kliničku mikrobiologiju, broj radova u literaturi koja se tiče osetljivosti ili rezistencije *Pseudomonas aeruginosa* poreklom od životinja a naročito od riba, upadljivo je manji. Razlog tome je sigurno mnogo manji značaj ovog uzročnika u veterinarskoj medicini.

Aeromonas vrstama prirodno stanište predstavljaju slatkovodni i slanovodni ekosistemi, ali se mogu naći i u kanalizacionim i otpadnim vodama (Araoju i sar. 1991). Različite vrste *Aeromonas*-a izolovane su iz različitih namirnica uključujući i ribe (Gobat i Jemmi 1993). *Aeromonadae* su uzročnici mnogih bolesti riba kao što su furunkuloza pastrmki izazvana *A. salmonicida* ili *A. hydrophila* i *A. veronii* koje izazivaju hemoragičnu septikemiju šarana, tilapije, grgeča, soma i lososa. *Aeromonas* vrste naročito *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii* bv. *sobria* mogu izazvati široki spektar kliničkih simptoma i sindroma kod ljudi kao što su akutni gastroenteritis,

infekcije rana i mekih tkiva i septikemiju (Janda i Abbott 2010, Piotrowska i Popowska 2015).

Aeromonas spp. imaju unutrašnju otpornost na aminopeniciline (osim *Aeromonas trota*), prvu i drugu generaciju cefalosporina (osim *Aeromonas veronii*) i ertrapienam (EUCAST and Comite de l'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. 2015). Kod *Aeromonas* spp. otkrivene su tri glavne klase beta laktamaza: klasa C cefalosporinaze, klasa D penicilinaze i klasa B metalo beta laktamaze sa pojavom klase B, C i D beta laktamaza kod *A. hydrophila* kompleksa, klasa C i D beta laktamaza kod *A. caviae*, klasa B i D beta laktamaza kod *A. veronii* i kod *A. veronii* bv. *sobria* klasa C cefalosporinaza (Libisch i sar. 2008). *Aeromonas* sojevi koji su stekli ESBL otpornost preko familije *Enterobacteriaceae* koja je široko rasprostranjena u okruženju i može predstavljati rezervoar ESBL gena rezistencije, *-bla* gena (Blaak i sar. 2014). Sojevi *Aeromonas* mogu nositi klasu A beta laktamaza koje pripadaju TEM familiji ESBL-a i takvi sojevi su prijavljeni u Francuskoj gde je epidemija klona *Enterobacter aerogenes* koji nosi TEM-24 i može prenositi plazmide na različite vrste *Aeromonas*-a putem horizontalnog transfera (Fosse i sar. 2004). Najrasprostranjenija klasa B MBLs kod *Aeromonas* vrsta je CphA tip čije sekvence su otkrivene kod *A. hydrophila* i *A. veronii* (Walsh i sar. 1997). Druge dve beta laktamaze pripadaju MBL, VIM i IMP i nalaze se na integronima i plazmidima, pronađene su kod izolata *A. hydrophila* i *A. caviae* (Libisch i sar. 2008; Neuwirth i sar. 2007). *Aeromonas* sojevi mogu da razmenjuju gene rezistencije sa patogenima izolovanim od ljudi kao što je *E. coli* (Sørum 2006). Dominantni geni nađeni kod sojeva *Aeromonas* poreklom od riba sa ribnjaka su *tet* geni i do sada je osam klasa *tet* gena (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetH*, *tetG* and *tetM*) identifikovano kod *Aeromonas* izolata poreklom iz akvakulture (Akinbowale i sar. 2007; Jacobs i Chenia 2007; Verner-Jeffreys i sar. 2009).

Prijavljeno je da IncU plazmidi koji sadrže tetraciklin rezistentne determinante kodirane sa Tn 1721 mogu biti prenošeni između patogena riba *A. salmonicida* i patogena riba i ljudi *A. hydrophila* i *A. caviae* i *E. coli* izolovane u različitim delovima Evrope (Rhodes i sar., 2000). Rezistencija na florfenikol (*flor* gene) i hloramfenikol (*catB* gene) primećena je među sojevima *Aeromonas* izolovanih iz ribnjaka (McIntosh i sar. 2008; Verner-Jeffreys i sar. 2009).

Do sada nigde u svetu kod bakterija iz roda *Aeromonas* poreklom od riba nije pronađen gen RmtB.

Stenotrophomonas maltophilia je široko rasprostranjena bakterija okruženja (Brooke 2012) ali i važan humani oportunistički patogen (Falagas i sar. 2009) koja poseduje unutrašnju otpornost na veliki broj dostupnih antibiotika (ampicilin, amoksicilin-klavulanate, ampicilin-sulbaktam, ticarcilin, piperacilin, piperacilin-tazobaktam, cefazolin, cefalotin, cefaleksin, cefadroksil, cefotaksim, ceftriakson, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, svi aminoglikozidi, trimetoprim, fosfomicin i tetraciklin - ali ne na doksiciklin, minociklin i tigeciklin) (EUCAST). *Stenotrophomonas maltophilia* sojevi su ubikvitarni i izoluju se od riba i vodenih ekosistema. Kod izolata *S. maltophilia* poreklom od školjki iz maloprodaje ali i iz morske vode u Hrvatskoj pronađeni su *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-116} i *bla*_{TEM-127} geni locirani na velikim plazmidima različitih veličina. Iako *S. maltophilia* ima hromozomski kodirane mehanizme rezistencije na β -laktame ovaj pronalazak je veoma važan pošto ukazuje na moguću ulogu *S. maltophilia* kao rezervoara determinanti odgovornih za otpornost na antibiotike (Maravić i sar. 2014). Od posebnog značaja kod *S. maltophilia* su geni odgovorni za rezistenciju na sulfametoksazol sa trimetoprimom, lek izbora za infekcije izazvane *S. maltophilia*. Visoka rezistencija na sulfametoksazol sa trimetoprimom kod *S. maltophilia* može nastati usled kombinacije gena *sul1* sa *dfrA* i *sul2* (Hu i sar. 2011).

2.8. Beta laktamaze proširenog spektra delovanja (ESBL)

Do sredine šezdesetih godina prošlog veka smatralo se da enzime iz grupe beta laktamaza proizvode samo gram-pozitivne bakterije. Prva beta laktamaza poreklom od enterobakterija otkrivena je i prečišćena 1964. godine iz soja *E.coli* izolovanog iz hemokulture čoveka obolelog od septikemije. Označena je kao TEM-1 beta laktamaza i u kasnijim godinama TEM-1 kao i TEM-2 beta laktamaze otkrivene su kod gotovo svih sojeva *E.coli* koji su bili rezistentni na peniciline i cefalosporine prve generacije. Ubrzo su bile otkrivene i SHV-1 beta laktamaze kod sojeva *Klebsiella* vrsta koje su bile rezistentne na beta-laktame. Nakon otkrića i OXA-laktamaza bilo je jasno da gram-negativne bakterije poseduju nekoliko različitih mehanizama proizvodnje beta laktamaza. Do 1975. godine sva tri tipa beta laktamaza bila su otkrivena kod gotovo svih sojeva enterobakterija koji su bili rezistentni na peniciline i cefalosporine a

izveštaji o otkrivanju ovih sojeva pristizali su sa svih kontinenata. Stoga su farmaceutske kuće početkom osamdesetih godina prošlog veka proizvele i plasirale u kliničku upotrebu cefalosporine proširenog spektra delovanja, takozvane oxyimino-cephalosporine (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson) koji su bili otporni na delovanje TEM-1, SHV-1 i OXA beta laktamaza. Ovi antibiotici bili su korišćeni u kliničkoj praksi, gotovo isključivo za lečenje pacijenata obolelih od intrahospitalnih septikemija izazvanih enterobakterijama rezistentnim na starije generacije penicilina i cefalosporina. Već 1983. godine na iznenađenje celokupne stručne javnosti, bili su otkriveni prvi sojevi *E.coli* i *Klebsiella* vrsta rezistentni i na ovu grupu antibiotika. Ispitivanjem ovog oblika rezistencije, izolovani su tada nepoznati, potpuno novi enzimi iz grupe beta laktamaza koji su nazvani ESBL, odnosno, beta laktamaze proširenog spektra delovanja (zbog sposobnosti razlaganja cefalosporina i penicilina proširenog spektra delovanja). Danas se zna da proizvodnju ESBL kodiraju mutirani geni odgovorni za produkciju TEM-1, TEM-2, SHV-1 i OXA beta laktamaza. ESBL laktamaze nastaju supstitucijom jedne ili više aminokiselina u molekulima TEM, SHV i OXA laktamaza. Do sada je otkriveno preko 150 novih enzima iz grupe ESBL koji su odgovorni za rezistenciju na sve cefalosporine uključujući i cefalosporine III generacije, kao i na sve peniciline i aztreonam. Međutim, u poslednjoj deceniji otkrivene su i varijante ESBL koje ne potiču od TEM, SHV i OXA laktamaza i koje se označavaju kao CTX-M, PER, VEB, i druge beta laktamaze.

Najzastupljeniji ESBL geni, CTX-M geni su široko rasprostranjeni zbog prisustva mobilnih genetičkih elemenata: insercionih sekvenci, transpozona, plazmida i integrona (Tacão i sar. 2012).

Geni odgovorni za proizvodnju ESBL smešteni su najčešće na plazmidima koji su uvek veći od 100 kb i putem kojih se lako prenose mehanizmima konjugacije i transdukcije na ostale enterobakterije u prirodi. Sojevi bakterija koji poseduju gene za proizvodnju ESBL najčešće ispoljavaju multirezistenciju, a nose i gene odgovorne za rezistenciju na većinu drugih antibiotika, uključujući i aminoglikozide, sulfametoksazol sa trimetoprimom i fluorohinolone. Stoga, praktično najveći klinički problem današnjice predstavljaju infekcije ljudi i životinja izazvane ESBL produkujućim sojevima *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* i *Shigella* vrsta. Enzimi iz grupe ESBL ne deluju na 7-alfa-metoksi cefalosporine, takozvane cefamicine

(cefexitin i cefotetan), kao ni na karbapeneme koji ostaju praktično jedini lekovi izbora za lečenje infekcija izazvanih ESBL produkujućim sojevima, jer još nisu otkriveni ESBL sojevi rezistentni na imipenem, meropenem i ertapenem. Takođe, na ESBL produkujuće sojeve deluje i kolistin, mada, ovaj antibiotik pokazuje jako toksično delovanje na organizam domaćina, kao i nitrofurantoin i fosfomicin koji se zbog specifične farmakokinetike mogu koristiti samo za lečenje urinarnih infekcija. Sojevi koji produkuju ESBL pokazuju različitu osetljivost na inhibitore beta laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam, tazobaktam). Interesantno je da enzimi iz grupe ESBL ne deluju na cefepim, koji pripada cefalosporinima IV generacije. Međutim, u toku terapije cefepimom kod pacijenata obolelih od infekcija izazvanih ESBL sojevima, brzo se razvijaju drugi mehanizmi rezistencije tako da upotreba cefepima nije preporučljiva osim u kombinaciji sa aminoglikozidima. Sojevi ESBL geografski su veoma rašireni i otkriveni su i kod životinja. Najveću opasnost po život pacijenata predstavlja pozitivan rezultat fenomena osetljivosti ESBL produkujućih sojeva na mnoge beta-laktamske antibiotike dobijen standardnim disk difuzionim metodom jer u uslovima *in vivo* lečenjem ovim antibioticima izostaje terapijski efekat. Stoga se pojava ESBL enzima naziva još i „skriveni mehanizam rezistencije“. Najvažniji faktori rizika za nastajanje ESBL produkujućih sojeva jesu prolongirana upotreba beta-laktamskih antibiotika, naročito u bolnicama. S obzirom da se cefalosporini III generacije upotrebljavaju i kod životinja, ESBL pozitivni sojevi lako se mogu pojaviti i na farmama kao i kod kućnih ljubimaca. Najviše zabrinjava pojava ESBL pozitivnih sojeva *Salmonella*. Do 1999. godine otkriveno je čak 3,4% ESBL pozitivnih *Salmonella* poreklom od ljudi i životinja u EU. Uprkos tome što su ESBL enzimi otkriveni pre 25 godina, ovom problematikom bavi se jako mali broj laboratorija.

2.9. Karbapenemaze

Karbapenemi su poslednja linija odbrane od patogena, kao što su *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* (Brown i sar., 1998).

Međutim, od prvog opisa *bla_{OXA}* gena, širom sveta se javlja porast u raširenosti novih determinanti za rezistenciju na karbapeneme. Na primer, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaza (KPC) tip enzima, Verona integron-encoded metallo-β-laktamaze (VIM), Imipenemaze Metallo-β-laktamaze (IMP) i New Delhi metallo-β-laktamaze

(NDM), i OXA-48 tip enzima je izolovan iz velikog broja bakterijskih rodova bez obzira na njihovu geografsku rasprostranjenost (Miriagou i sar., 2010, Walsh i sar., 2011). Mehanizmi otpornosti na karbapeneme nađeni su kod *Escherichia coli* i *Klebsiella* izolata u bolničkim sredinama, a u manjoj meri i u van bolničkim sredinama/zajednici, tako da su i zdravi ljudi kao nosioci počeli da predstavljaju problem (Nordmann i sar., 2012).

Pojava i globalno širenje internacionalnog klona 1 penicilin rezistentne *Streptococcus pneumoniae* (Klugman, 2002) i nedavno nađenih New Delhi Metallo- β -laktamaze (bla_{NDM-1}) produkujućih *Enterobacteriaceae*, koje inkativišu sve β -laktamske antibiotike, uključujući karbapeneme, su dobar primer. Smatra se da bla_{NDM-1} potiče sa Indijskog podkontinenta ali se zbog kretanja ljudi kasnije može naći i u Severnoj Americi i u Ujedinjenom Kraljevstvu i drugim Evropskim zemljama (Arya i Agarwal, 2011; Walsh i sar., 2011).

Stečene karbapenemaze se pojavljuju kao odlučujuća rezistencija kod gram negativnih bakterija, uključujući *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* i druge gram negativne nefermentišuće bakterije. Znatno broj stečenih karbapenemaza je identifikovan tokom poslednjih par godina i geni koji kodiraju ove enzime su povezani sa mobilnim genetičkim elementima koji omogućavaju njihovo brzo širenje u kliničkim okvirima. Stoga je otkrivanje i praćenje mikroorganizama koji produkuju karbapenemaze postalo veoma važno kako pri izboru odgovarajuće terapijske šeme tako i pri uvođenju kontrolnih mera pri infekciji.

Većina stečenih karbapenemaza spada u tri od četiri poznate klase beta laktamaza nazvanih Ambler klasa B (metallo – β – laktamaze (MBLs)), Ambler klasa A i Ambler klasa D (oksidicilinaze (OXAs)). Metallo – β – laktamaze, uglavnom VIM i IMP tipovi, se šire najviše kroz *Pseudomonas aeruginosa* i makar u nekim regionima, kroz *Acinetobacter baumannii* i *Enterobacteriaceae*, naročito kod *Klebsiella pneumoniae* (Queenan i Bush, 2007, Walsh, 2008). Takođe, neke druge vrste su glavni proizvođači KPC tipa klase A karbapenemaze (Queenan i Bush, 2007, Nordmann i sar., 2009), a te druge vrste u kojima su ovi enzimi identifikovani uključuju *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. i *Pseudomonas* spp. (Nordmann i sar., 2009, Queenan i Bush, 2007, Walsh, 2008, Bennett i sar., 2009). Pored toga, enzimi tipa GES ređe klase A, koji su tipične beta laktamaze proširenog

spektra delovanja (ESBL) čija je aktivnost spektra proširenja usmerena ka karbapenemazama, identifikovani su kod *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* i *E.coli* (Naas i sar., 2008, Moubareck i sar., 2009).

Brze promene u nosiocima karbapenemaza se mogu javljati zato što su ovi geni povezani sa mobilnim genetičkim elementima, i pojava novih tipova enzima i njihovih varijanti mogu se očekivati u budućnosti.

U sistemimima za praćenje karbapenemaza, *korezistencija* takođe mora biti praćena, kao i udruživanje karbapenemaza gena sa onima koji utiču na ne β -laktamske antibiotike. Većina je pokazala da su transferabilne, uključujući one skoro opisane koji utiču i na fluorohinolone (npr. Qnr, aac(6 ϕ)-Ibcr i qepA) ili aminoglikozide (npr. Arm i Rmt). Štaviše, dok su neke determinante karbapenemaza povezane sa integronima, takođe se moraju uzeti u obzir i druge genske kasete sa rezistencijom kao one koje uključuju gene rezistencije na aminoglikozide ili trimetoprim i sulfonamide. Dodatno, zanimljivo je pratiti istovremeno prisustvo drugih β -laktamskih gena kao što su oni koji kodiraju ESBL ili AmpC tip enzima. Takvo udruživanje više nije retkost (Queenan i Bush, 2007, Yildirim i sar., 2007).

Pojava istih genetskih elemenata bakterija koje su otporne na antibiotike u različitim ekološkim nišama ukazuje na jedinstvenost rezistoma uglavnom zbog brzog procesa širenja, ukazujući na hitnu potrebu integrisanog pristupa ovom problemu.

2.10. Stečene 16S rRNK metiltransferaze kod gram negativnih bakterija

Poznato je da su velike količine aminoglikozida korišćene u poslednjoj deceniji u lečenju infekcija prouzrokovanih uglavnom gram-negativnim, ali i gram-pozitivnim bakterijama. Sa druge strane, u tom periodu, ove bakterije su razvile nekoliko mehanizama rezistencije koji inhibiraju dejstvo aminoglikozida. Među ovim mehanizmima, najčešća je enzimaska modifikacija molekula aminoglikozida. Iako je metilacija ciljnog mesta za vezivanje aminoglikozida na ribozomu kod bakterija koje proizvode aminoglikozide detaljno opisana kao strategija samoodbrane još 80-tih godina, do nedavno se smatralo da ovaj mehanizam otpornosti nije prisutan kod klinički značajnih bakterija. Međutim, u današnje vreme metilacija ciljnog mesta na ribozomima odgovorna je za visok nivo otpornosti bakterija na aminoglikozide i to je mehanizam

koji izaziva veliku zabrinutost kada su pitanju klinički značajne gram-negativne bakterije.

2.10.1. Prvi opis i nomenklatura

Stečene 16S rRNK metiltransferaze (MT) su prvi put prijavljene 2003. godine (Galimand i sar., 2003). U Francuskoj je 2000. godine iz urina izolovana *Klebsiella pneumoniae*, koja je bila visoko rezistentna na sve 4,6-DOS aminoglikozide i fortimicin. Genetska determinanta odgovorna za taj fenotip klonirana je u laboratorijski soj *E. coli*. Ubačena sekvenca je upoređena sa sekvencama u GenBank bazi podataka i otkrivena je podudarnost sa delom sekvence plazmida izolovanog od soja *Citrobacter freundii* nađenog u Poljskoj (pCTX-M3), koja je deponovana u GenBank 2002. godine pod pristupnim brojem AF550415. Ipak, iako je cela sekvenca nukleotida pCTX-M3 ranije opisana, ova 16S rRNK MT je bila neklasifikovana i neobjavljena sve dok Galimand i saradnici nisu nazvali ovaj novi protein ArmA (Aminoglycoside resistance methyltransferase A). Samo 4 meseca nakon objavljivanja podataka o proteinu ArmA objavljen je još jedan rad koji opisuje 16S rRNK MT kod gram negativnih bakterija (Yokoyama i sar., 2003). Gen veličine 756bp označen kao *rmtA* (ribosomska RNK metiltransferaza A), identifikovan je kod soja *P. aeruginosa* izolovanog iz kliničkog uzorka u Japanu 1997. godine. Ovaj gen je pokazao visok nivo rezistencije na arbekacin, amikacin, gentamicin, kanamicin i tobramicin kada je kloniran i ubačen u sojeve *E. coli* i *P. aeruginosa*. Potom su prvi put otkrivene i stečene 16S rRNK metiltransferaze, RmtB i RmtC takođe u bolnicama u Japanu. Prvi je izolovan iz soja *Serratia marcescens* 2002. godine, a objavljen 2004. godine (Doi i sar., 2004). Metiltransferaza RmtB poseduje aminokiselinsku sekvencu koja ima 82% podudarnosti sa sekvencom RmtA. Prva identifikacija RmtC je objavljena 2006. godine u Japanu (Wachino i sar., 2006b). Pronađena je kod soja *Proteus mirabilis* izolovanog 2003. godine i potvrđeno je da pripada 16S rRNK metiltransferazama i da ima isti profil rezistencije kao i ArmA, RmtA, ili RmtB. U narednim godinama otkrivene su i druge 16S rRNK MT među gram negativnim bakterijama. Metiltransferaza RmtD je prvi put prijavljena 2007. godine kod kliničkog izolata *P. aeruginosa* u Brazilu (Doi i sar., 2007c), a njegova varijanta RmtD2, koja poseduje 9 različitih aminokiselina u poređenju sa RmtD nađena je u Argentini 2011. godine (Tijet i sar., 2011). Prva i jedina

identifikacija RmtE metiltransferaze i to kod soja *E. coli* poreklom od goveda u Sjedinjenim Američkim Državama objavljena je 2010. godine (Davis i sar., 2010). Metiltransferaza RmtF je identifikovana kod kliničkog soja *K. pneumoniae* na ostrvu Reunion (Galimand i sar., 2012). 2013. godine objavljeno je da su kod sojeva *K. pneumoniae* iz Brazila i Iraka nađeni geni RmtG i RmtH (Bueno i sar., 2013; O'Hara i sar., 2013). Za sve navedene metiltransferaze se smatra da su (ili je potvrđeno da su) N7-G1405 16S rRNK MT. Izuzetak je NpmA, koji je prijavljen 2007. godine kod kliničkog soja *E. coli* u Japanu, a potvrđeno je da vrši metilaciju na poziciji A1408 i pokazuje odgovarajuću fenotipsku rezistenciju u skladu sa tom funkcijom (Wachino i sar., 2007). Iako je to jedini put da je NpmA identifikovan, do sada ni jedna druga N1-A1408 MT nije prijavljena kod gram-negativnih bakterija.

Što se tiče nomenklature ovih stečenih 16S rRNK MT kod gram-negativnih bakterija, zbog njihovog povećanog pojavljivanja i otkrivanja 2008. godine Doi i saradnici su predložili neka pravila u cilju sprečavanja konfuzije u nomenklaturi 16S rRNK metiltransferaza, da bi se izbegao slučaj istovremenog postojanja dva sistema klasifikacije kao kod aminoglikozidnih acetiltransferaza. Stoga su predložene sledeće smernice: gen koji ima aminokiselinsku podudarnost veću od 95% sa najbližom poznatom 16S rRNK MT biće označen brojem počevši od 2 (npr. rmtD2). Gen čije je poklapanje aminokiselina između 50 i 95 % sa najbližom poznatom 16S rRNK MT dobija novo slovo alfabeta u skladu sa najbližim postojećim imenom gena (npr. rmtF, armB). Ako gen pokazuje sličnost sa aminokiselinama manju od 50% sa najbližom postojećom 16S rRNK MT ili se dokaže da metiliše novu reziduu 16S rRNK, može mu se dodeliti kompletno novo ime gena (npr. npmA).

2.10.2. Klinički značaj i fenotipska rezistencija pod dejstvom 16S rRNK MT

Uprkos tome, što su enzimi koji modifikuju aminoglikozide najčešći mehanizmi rezistencije na ove antibiotike, stečene 16S rRNK metiltransferaze su u centru pažnje od momenta kada su prvi put identifikovane zbog nekoliko različitih faktora (Doi i Arakawa, 2007.godina). Ovo uključuje ekspresiju gena koje nose mobilni genetički elementi ili njihovu povezanost sa drugim važnim mehanizmima rezistencije, kao što su NDM-1 metalo- β -laktamaze (karbapenemaze). Glavni razlog za uzbunu je u vezi sa njihovom funkcijom, s obzirom da stečene 16S rRNK metiltransferaze nose rezistenciju

na većinu dostupnih aminoglikozida u kliničkoj praksi i mogu da rastu i u prisustvu visokih koncentracija aminoglikozida u poređenju sa vrednostima MIK kod bakterije koje proizvode enzime koji modifikuju aminoglikozide. Stečene 16S rRNK metiltransferaze se mogu naći i u gram-negativnim bakterijama koje pripadaju komensalnim bakterijama, a često se nalaze kod gram-negativnih patogenih bakterija izolovanih iz bolničkih i vanbolničkih infekcija (Wachino i Arakawa, 2012). Važan je i podatak da su bakterije kod kojih se najčešće prijavljuje prisustvo 16S rRNK metiltransferaza svrstane u tzv. ESKAPE grupu patogena. Ova grupa obuhvata multirezistentne sojeve *E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, i *Enterobacter* spp., a po rezultatima Centra za kontrolu bolesti (CDC), ovih šest ESKAPE bakterija su odgovorne za 2/3 svih infekcija koje su u vezi sa zdravstvenim sistemom.

N7-G1405 16S rRNK metiltransferaze (ArmA, RmtA-H) imaju visok nivo otpornosti na 4,6-DOS aminoglikozide kao što gentamicin, amikacin, tobramicin, kanamicin, pa čak i arbekacin. Međutim, oni ne smanjuju osetljivost na apramicin (4-DOS), 4,5-DOS (neomicin) ili streptomycin (non DOS). Po pravilu, kada se ovi geni kloniraju i aktiviraju u laboratorijskom soju *E. coli*, vrednosti MIK su ≥ 128 mg/L za sve 4,6- DOS. Divlji sojevi koji poseduju N7-G1405 16S rRNK MT uopšteno pokazuju vrednosti MIK > 1024 mg/L za sve 4,6-DOS zbog koegzistencije metiltransferaza i nekih enzima koji modifikuju aminoglikozide u istom soju. Nasuprot ovome, jedina do danas identifikovana N1-A1408 16S rRNA MT kod gram-negativnih bakterija NpmA, nosi visok nivo rezistencije na 4,5-DOS (neomicin), 4-DOS (apramicin), ali takođe značajno smanjuje osetljivost na 4,6-DOS (Wachino i sar., 2007). To znači da ovaj tip metiltransferaza izaziva još veću brigu, zato što pokriva širi opseg rezistencije na aminoglikozide. Kombinacija gentamicina i amikacina u visokoj koncentraciji se najčešće koristi za fenotipsko ispitivanje prisustva 16S rRNK metiltransferaza kod bakterija.

Svakako, fenotipska ispitivanja daju samo početni pristup, a jedini potvrdni metod predstavlja dokazivanje gena poznate 16S rRNK metiltransferaze reakcijom lančane polimeraze (PCR).

2.10.3. Zastupljenost i raširenost stečenih 16S rRNK metiltransferaza

Stečene 16S rRNK metiltransferaze su najzastupljenije u Aziji. Iznenađujuće je da nema tako mnogo izveštaja iz Sjedinjenih Američkih Država kao što ih ima iz Azije i Evrope i obično su povezani se nefermentativnim gram-negativnim bakterijama (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*) (Doi i sar., 2007b; Fontes i sar., 2011). Malo je podataka o rasprostranjenosti stečenih metiltransferaza u Africi. Kada se poredi globalna rasprostranjenost poznatih stečenih 16S rRNK metiltransferaza može se uočiti jasna podela: ArmA i RmtB su najzastupljenije metiltransferaze do sada, a RmtA, koja je prvo identifikovana sa ArmA samo je 4 puta prijavljena (Yokoyama i sar., 2003; Yamane i sar., 2007; Jin i sar., 2009; Poirel i sar., 2011b), dok su RmtE, RmtF, RmtG, RmtH i NpmA metiltransferaze samo jednom prijavljene (Wachino i sar., 2007; Davis i sar., 2010, Galimand i sar., 2012; Bueno i sar., 2013; O'Hara i sar., 2013). Smatra se da su metiltransferaze RmtC i RmtD slabo rasprostranjene, međutim, poslednjih godina postoji jasan porast u broju publikacija koje prijavljuju prisustvo RmtC. Obično, jedan soj proizvodi jednu metiltransferazu, mada ima nekoliko radova koji opisuju koprodukciju i ArmA i RmtB ili ArmA i RmtC od strane istog soja (Ma i sar., 2009, Mushtaq i sar., 2011). Što se tiče visoke rasprostranjenosti stečenih metiltransferaza, ArmA je prijavljen u nekoliko zemalja Evrope i Azije, ali i u Sjedinjenim Američkim Državama. Prisustvo RmtB metiltransferaze je široko rasprostranjeno po svetu, iako u poređenju sa ArmA, pojava i širenje RmtB u Evropi su minimalni i nađena je samo u Francuskoj, Belgiji i Grčkoj. Među retko prijavljivanim metiltransferazama nalazi se RmtC koja je nađena svega nekoliko puta, ali u različitim delovima sveta. Metiltransferaza RmtA je uglavnom nađena u Aziji, a RmtD/D2 pronađeni su u Južnoj Americi. RmtD se smatra visoko zastupljenim u Brazilu.

2.10.4. Rezervoari i putevi širenja stečenih 16S rRNK metiltransferaza

Enzimi ArmA i RmtB koji su najzastupljeniji i najrasprostranjeniji, najčešće su nađeni kod vrsta iz familije *Enterobacteriaceae*. Njihovo prisustvo je prijavljeno i kod nefermentativnih gram-negativnih bakterija kao što su *P. aeruginosa* ili *A. baumannii* koji predstavljaju globalnu pretnju kao nozokomijalni patogeni. Kod sojeva *P. aeruginosa* je nađena većina RmtA ili RmtD metiltransferaza u poređenju sa drugim stečenim 16S rRNK MT, koje su uglavnom nađene kod sojeva iz familije

Enterobacteriaceae (Doi i sar., 2007b; Jin i sar., 2009). Dugo se smatralo da je RmtC prisutan samo kod izolata *P. mirabilis*, pošto je kod njega prvi put i detektovan u Japanu (Wachino i sar., 2006b), a dve godine kasnije kod izolata *P. mirabilis* u Australiji (Zong i sar., 2008). U međuvremenu nije bilo prijavljenih slučajeva pronalaska *rmtC* gena sve do njegovog otkrića kod sojeva *Salmonella enterica* serovar Virchow izolovanih od ljudi i jednog soja izolovanog iz namirnice (Hopkins i sar., 2010).

Stečene 16S rRNK MT su nađene kod gram-negativnih bakterija, ali ne i kod gram-pozitivnih, pa se tako postavlja pitanje da li su ovi enzimi funkcionalni kod gram-pozitivnih bakterija. Stečene metiltransferaze su uglavnom nađene kod sojeva poreklom od ljudi sa bolničkim ili vanbolničkim infekcijama. Raniji nalaz ArmA kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje (Gonzalez- Zorn i sar., 2005) postavlja pitanje da li i drugi izvori kao što su životinje ili namirnice animalnog porekla mogu biti uključeni u nastajanje ili širenje stečenih 16S rRNK MT.

Jedine stečene 16S rRNK metiltransferaze do danas nađene kod životinja su ArmA, RmtB i RmtE . Nema podataka da je i jedan gen za ove metiltransferaze nađen kod sojeva bakterija koje su poreklom od riba. Gen za RmtD koji je pronađen kod bakterije izolovane iz reke u Brazilu (Fontes i sar., 2011), kao i *rmtC* gen kod soja *Salmonella* izolovanog iz namirnice u Velikoj Britaniji (Hopkins i sar., 2010), klonski su bili povezani sa izolatima poreklom od ljudi, što ukazuje na vezu između različitih izvora i prenosa ovih mehanizama rezistencije.

2.10.5. Lokacija gena za 16S rRNK metiltransferaze

Zabrinjavajući faktor je što su strukturni geni stečenih 16S rRNK MT uglavnom smešteni na transferabilnim plazmidima umesto na hromozomima, što dovodi do mogućnosti vertikalnog, ali i horizontalnog prenosa, i njihovog bržeg širenja. Geni *armA* i *rmtB* do sada nisu nađeni na hromozomima. Sa druge strane *rmtE*, *rmtF* i *rmtG* su nađeni na plazmidima koji se ne mogu preneti konjugacijom (Davis i sar., 2010; Galimand i sar., 2012; Bueno i sar., 2013). Interesantno, *rmtD* koji je najzastupljeniji u Južnoj Americi, se uvek nalazi na hromozomu, dok je primećeno da se *rmtD2* širi među sojevima koji nisu srodni i da može biti prenet konjugacijom. Gen *rmtC* koji je pronađen kod soja *P. mirabilis* nalazi se na plazmidima, dok je kod klona *S. enterica* u Velikoj Britaniji potvrđeno da se nalazi na hromozomu (Laura Hidalgo i sar. 2012).

Za plazmide koji se nalaze kod familije *Enterobacteriaceae* ispitane su i određene glavne grupe inkompatibilnosti, a to su: HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K i B/O (Carattoli, 2009). Među njima, u vezi sa rezistencijom na antibiotike sledeće grupe su: F, A/C, L/M, I1, HI2 i N. 16S rRNK metiltransferaze posredovane plazmidima se uglavnom nalaze na plazmidima koji pripadaju sledećim inkompatibilnim grupama: IncA/C, IncN, IncL/M i IncF.

IncA/C plazmidi mogu da se umnožavaju u bakterijama iz familije *Enterobacteriaceae*, ali takođe i u sojevima *Photobacterium damsela* i *Aeromonas salmonicida*. Nađeni su kod sojeva poreklom od ljudi i životinja.

IncN plazmidi su uglavnom povezani sa sojevima poreklom od životinja. Smatra se da učestvuju u prenošenju *bla*_{CTX-M-1} gena, što ukazuje da su životinje rezervoari ovih ESBL. Najčešće su nađeni kod sojeva *E. coli* izolovanih iz creva ptica i kod *Salmonella* spp. iz mesa u maloprodajnim radnjama, ali i kod životinja sa farmi (Johnson i sar., 2007).

Plazmidi koji pripadaju IncL/M familiji se dovode u vezu sa širenjem *bla*_{CTX-M-3} među sojevima kod ljudi u Poljskoj (Baraniak i sar., 2002).

IncF tip plazmida nisu homogena grupa, pokazuju veliko variranje u veličini (od 50 do 200 kb), i često nose više od jednog replikona, jer mogu nositi repFII replikon sam ili u kombinaciji sa repFIA i/ili repFIB. Plazmidi u ovoj grupi se povezuju sa širenjem pandemičnih CTX-M-15 β-laktamaza (Woodford, 2008).

Gen *armA* se nalazi i na IncA/C i na IncHI2 plazmidima kod sojeva iz Azije izolovanih pre 2001. godine, ali se kasnije uglavnom vezuje za IncF, IncL/M i netipizirane plazmide (Kang i sar., 2008). Međutim, važno je naglasiti da se *armA* gen nađen kod izolata *E. coli* poreklom od svinje u Španiji nalazio na IncN plazmidu (Gonzalez-Zorn i sar., 2005).

Na IncF grupi plazmida se najčešće nalazi *rmtB* gen, ali ima i izuzetaka.

Što se tiče ostalih gena za stečene 16S rRNK MT, IncA/C je glavna inkompatibilna grupa plazmida na kojoj se nalaze ovi geni.

Zbog toga što se stečene 16S rRNK MT obično nalaze na velikim konjugabilnim plazmidima, koji imaju sposobnost da akumuliraju različite gene rezistencije, bakterije koje proizvode ove MT mogu da razviju multirezistenciju. Kod sojeva koji poseduju

16S rRNK MT, najviše zabrinjava mogućnost pojave istovremene rezistencije na hinolone i beta laktamske antibiotike.

U poslednjoj deceniji pojava rezistencije na hinolone posredovane plazmidima (plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR)) još više ukazuje na značaj rezistencije na antibiotike (Poirel i sar., 2012). Ovaj vid rezistencije se povezuje sa stečenim 16S rRNK MT kod sojeva koji proizvode ArmA, RmtB ili RmtC. Većina publikacija koja ukazuje na vezu između RmtB i PMQR opisuje sojeve poreklom od životinja (Liu i sar., 2008; Deng i sar., 2011a, 2011b).

Publikovani su radovi koji prijavljuju nalaz bakterija koje imaju istovremeno prisutne gene stečenih 16S rRNK MT i KPC gene ili NDM-1 gene ili OXA gene koji se nalaze na velikim konjugabilnim plazmidima i to je rastući problem u svetu (Livermore i sar., 2011b; Solé i sar., 2011; Dortet i sar., 2012; Dolejska i sar., 2013).

2.11. Otpadne vode kao rezervoar bakterija otpornih na antibiotike

Ubikvitarne bakterije u okruženju, koje mogu da kolonizuju i ljude, su posebno važne u procesu širenja bakterija koje su otporne na antibiotike u životnoj sredini i njihovoj umešanosti u zdravlje ljudi. Brojna istraživanja govore o pojavi rezistencije na antibiotike kod ubikvitarnih bakterija izolovanih iz otpadnih voda, koje su takođe prepoznate kao oportunistički patogeni, uglavnom bolničkih infekcija. Bakterije otporne na antibiotike sa kliničkim značajem a nađene u različitim ekološkim nišama su između ostalih članovi rodova *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, i *Shigella* (Ferriera da Silva i sar., 2006, 2007; Watkinson i sar., 2007; Novo i Manaia, 2010; Czekalski i sar., 2012). Tokom poslednjih godina, upotreba nezavisnih pristupa donela je dodatne uvide o obilju i raznovrsnosti gena rezistencije u otpadnim vodama i u efekte antibiotika na te bakterijske zajednice (Czekalski i sar., 2012; Oberlé i sar., 2012; Novo i sar., 2013). Nekoliko istraživanja je iznelo dokaze da u otpadnim vodama kao staništu postoji veliki potencijal za horizontalni transfer gena posredstvom plazmida i integrona (Moura i sar., 2010; Zhang i sar., 2011). Uprkos važnosti otpadnih voda kao rezervoara za bakterije otporne na antibiotike i važnost prerade otpadnih voda kao mera kontrole širenja te otpornosti, broj istraživanja koja su objavljena je i dalje mali.

Među vodenim ekosistemima, kanalizaciono stanište predstavlja najvažniji rezervoar bakterija otpornih na antibiotike i njihovih gena. Ovaj tip staništa sadrži ljudske i životinjske ekskrete sa oblinim količinama komensalnih i patogenih bakterija otpornih na antibiotike (Yang i sar., 2011; Ye i Zhang, 2011, 2013; Novo i sar., 2013).

Pošto se antibiotici ne razgrađuju u potpunosti u telu ljudi i životinja, rezidue antibiotika, njihovi metaboliti i transformisani produkti se u velikom obimu nalaze u gradskim postrojenjima za preradu otpadnih voda (Segura i sar., 2009; Michael i sar., 2013).

Trenutno dostupna literatura ukazuje da je većina genetskih elemenata bakterija otpornih na antibiotike nađena u kliničkim izolatima takođe nađena u otpadnim vodama, skoro odmah po njihovom prijavljivanju u bolnicama (Rizzo i sar., 2013).

Značaj otpadnih voda kao zasebnog staništa u širenju otpornosti na antibiotike kako među humanim patogenima tako i među komensalnim i bakterijama životne sredine, se sve više naglašava (Baquero i sar., 2008; Marshall i Levy, 2011; Czekalski i sar., 2012; Rizzo i sar., 2013). U postrojenjima za preradu otpadnih voda smanjuje se opterećenje bakterijama otpornim na antibiotike, ali tretirana voda i dalje nosi u sebi povišen nivo ovih bakterija i može da dovede do selekcije sojeva koji su multirezistentni (Czekalski i sar., 2012).

Rutinsko prečišćavanje otpadnih voda često nije dovoljno da bi se uklonile rezidue antibiotika koje ulaze u sistem (Michael i sar., 2013). Tako da takvi mikrozagađivači, vršeći selektivan pritisak, olakšavaju izbor koje će bakterije razviti otpornost na antibiotike ili steći gene rezistencije horizontalnim transferom gena (Martinez, 2009). Iako je količina antibiotika mala, transformisana i razgrađena u okruženju, pojava ovih mikrozagađivača je prijavljena širom sveta, i antibiotici svih klasa su otkrivenih u otpadnim vodama u koncentracijama u rasponu od ng^{-1} do mgL^{-1} (Michael i sar., 2013).

Ipak, tokom poslednje decenije saznanja o ovoj oblasti su značajno porasla i važnost sistema za preradu otpadnih voda u širenju otpornosti na antibiotike je nedvosmisleno prikazana. Stoga, moguće je postaviti neka specifična pitanja koja bi bila fokus u istraživanjima koja sleduju. Primeri ovih pitanja bi bili: 1. identifikacija uslova koji mogu unaprediti ili ublažiti pojavu horizontalnog transfera gena i selekciju otpornosti na antibiotike (koji zagađivači, u kojoj koncentraciji, temperatura, pH, itd.);

2. klasifikacija i kvantifikacija rizika, na primer, verovatnoća da će bakterija otporna na antibiotike ili njeni geni iz otpadnih voda doći u kontakt sa ljudima i stvoriti zdravstveni problem; 3. poboljšanje procesa prečišćavanja otpadnih voda u cilju smanjenja opterećenja bakterijama otpornim na antibiotike i njihovim genima (Dodd, 2012).

2.12. Antibiotici

Antibiotici, za upotrebu u veterinarskoj medicini, su uvedeni neposredno pošto su postali dostupni za lečenje bolesti kod ljudi sredinom četrdesetih godina prošlog veka (McEwen, 2006). Iako su neki lekovi napravljeni isključivo za upotrebu u veterini, većina pripada istim klasama antibiotika kao oni koji se upotrebljavaju u humanoj medicini sa identičnim ili sličnim strukturama (Swann, 1969; Heuer i sar., 2009).

Mnogi različiti programi za praćenje širom sveta počeli su da prate AMR i opseg istraživačkih aktivnosti i intervencija je pokazao da upotreba antibiotika u stočarstvu ima veliki uticaj na pojavu i širenje različitih vidova otpornosti bakterija na antibiotike. Ubrzano i paralelno smanjenje broja rezistentnih sojeva *Enterococcus faecium* poreklom od svinja i živine prijavljeno je u Danskoj nakon zabrane upotrebe promotora rasta u stočarstvu (Aarestrup i sar., 2001). Očigledno je gledajući Danski integrisani AMR program za praćenje i istraživanje i izveštaj NORM/NORM-VET Report (NORM/NORM-VET, 2011) da smanjenje upotrebe antibiotika sa strogim pravilima može i dalje biti najbezbedniji način kontrole razvoja i širenja otpornosti bakterija na antibiotike u ovoj grani privrede u budućnosti.

U veterinarskoj medicini upotreba antibiotika kod kućnih ljubimaca ali i konja je ograničena samo u terapijske svrhe. Kućni ljubimci se sve više tretiraju kao članovi porodice, a u kontekstu upotrebe napredne antibiotske terapije njihovih zaraznih bolesti. Na primer, kožne infekcije izazvane stafilokokama kod pasa sa ili bez pratećih alergijskih reakcija rezultiraće većom upotrebom polu-sintetskih penicilina zbog neefikasnosti penicilina u borbi protiv penicilinaza produkujućih sojeva *Staphylococcus pseudintermedius* (Yoon i sar., 2010). Šta više, pojava meticilin rezistentnih *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), meticilin rezistentnih *Staphylococcus aureus* (MRSA), i ESBL produkujućih *E. coli* koje pokazuju otpornost na više antibiotika dovodi do pojave otpornosti bakterija na antibiotike u veterinarskoj maloj praksi (Wieler i sar., 2011).

Povećan razvoj i širenje bakterija otpornih na antibiotike kod kućnih ljubimaca zbog neracionalne upotrebe antibiotika, naročito prepisivanja antibiotika širokog spektra delovanja bez precizne dijagnostike, neizbežno dovodi do: 1. zdravstvenih problema životinja (povišen mortalitet i morbiditet), 2. ekonomskih problema kod vlasnika (češće posete veterinarima i duži boravak u bolnicama), 3. ekonomskih problema veterinara (mogući gubitak pacijenata i skupe dezinfekcione mere) 4. problema zdravlja ljudi (rizik od zoonotskog prenošenja). Zbog ove pretnje veterinari u maloj praksi bi trebalo da prepisuju antibiotike širokog spektra delovanja samo po antibiogramu kao i da edukuju vlasnike kućnih ljubimaca kako da se odnose sa životinjama koje su pod antibiotskom terapijom.

Ograničena su istraživanja bakterijske flore koja je rezistentna na antibiotike kod životinja u zoološkim vrtovima (Gopee i sar., 2000) kao i divljim vrstama životinja (Gilliver i sar., 1999, Mitchell i sar., 2001).

Međutim, pojava bakterija kod životinja otpornih na antibiotike koji su od presudnog značaja za lečenje ljudi je ono što najviše zabrinjava. Ovo uključuje skorašnju pojavu ESBL produkujućih i karbapenemaza pozitivnih bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* kod farmskih životinja (Horton i sar., 2011) i kod riba na ribnjacima u Kini (Jiang i sar., 2012), pojavu MRSA ST398 povezanu sa farmama (glavni klon povezan sa svinjama) (Cuny i sar., 2010; Kluytmans, 2010; Weese, 2010) kao i plazmid posredovanu otpornost na hinolone izolovane i iz životinja, namirnica animalnog porekla ali i akvarijumskih ribica (Poirel i sar., 2005; Nordmann i sar., 2011, Dobiasova i sar., 2014). Na žalost, ima nekoliko primera u literaturi koji ukazuju da su se te bakterije već raširile širom Evrope i u druge delove sveta i da imaju ogroman uticaj na zdravlje ljudi (Angulo i sar., 2004; Heuer i sar., 2009; Forsberg i sar., 2012).

Kolistin je prvi put uveden u upotrebu 1959. godine. S obzirom na činjenicu da je nefrotoksičan, kolistin godinama nije upotrebljavan u humanoj medicini za lečenje sistemskih infekcija, pa bakterije koje izazivaju infekcije kod ljudi nisu razvile otpornost na njega. Ovaj podatak je dobio veliki značaj kada je otkrivena rezistencija na karbapeneme (NDM, OXA, KPC), koja se raširila po svetu, pa je kolistin ostao efikasan u lečenju infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima rezistentnim i na karbapeneme.

Upotreba kolistina u Evropi u veterinarskoj medicini je ograničena na oralnu upotrebu kod crevnih bolesti ne duže od 7 dana, dok upotreba u profilaktičke svrhe nije

dozvoljena. Doze koje su dozvoljene su relativno visoke i iznose od 75000 do 100000 IU/kg/dan, a smatra se da bi tako visoke doze mogle smanjiti selektivan pritisak za razvoj rezistencije.

Evropska unija ima najstrožu kontrolu upotrebe antibiotika kod farmskih životinja na svetu još od 2006. godine kada je zabranila davanje antibiotika kao promotora rasta, pa ipak ima veliku potrošnju kolistina.

U Kini se koristi 12000 tona kolistina godišnje u poljoprivredi. Kolistin se koristi u cilju profilakse ili kao promotor rasta na različitim farmama u Kini, pa su mnoge bakterije poreklom iz zemljišta razvile otpornost na kolistin.

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je još 2012 godine kolistin stavila na listu antibiotika od kritičnog značaja, ali u globalnom programu praćenja bakterijske rezistencije u 2014 godini praćenje rezistencije na kolistin nije bilo uključeno.

Evropska medicinska agencija je 2015. godine dala podatke o upotrebi kolistina u veterinarskoj praksi u zemljama Evrope. Upotreba je varirala u rasponu od 0 mg (Finska, Island, Norveska) do više od 20 mg (Italija, Španija) po kilogramu životinjske biomase tokom 2013.godine.

Krajem 2015. godine izašao je rad u elektronskoj formi časopisa *Lancet Infectious Diseases* u kome je nekoliko istraživača sa univerziteta iz Kine, Velike Britanije i Sjedinjenih Američkih Država objavilo da su identifikovali nov mehanizam rezistencije na kolistin, *mcr-1* gen. Prisustvo novog gena rezistencije je otkriveno kod bakterija izolovanih iz mesa i bakterija poreklom od ljudi, pa se smatra da potiče od preterane upotrebe kolistina u poljoprivredi i da može lako da se prenosi među bakterijama, kao i da se širi globalno (Liu i sar., 2016).

Zbog toga su hitno i Evropa i Kina počele da preispituju upotrebu kolistina u poljoprivredi. Evropska medicinska agencija je zatražila od Evropske komisije dozvolu da ispita da li bi upotrebu kolistina trebalo ograničiti., dok u Kini centralna vlada proučava opciju potpune zabrane upotrebe kolistina u poljoprivredi.

Za samo tri meseca od prvog opisa objavljeni su radovi koji govore o tome: da se *mcr-1* gen proširio na većinu kontinenata; da je nađen kod bakterija poreklom od različitih farmskih životinja, kod bakterija iz okruženja uključujući i reke, kod bakterija nađenih u različitim vrstama mesa i povrća, kod bakterija izolovanih od inficiranih pacijenta, ali i od asimptomatskih nosioca uključujući i internacionalne putnike.

Utvrđeno je prisustvo gena kod različitih vrsta bakterija, ali dominantno kod *E. coli* i na nekoliko različitih plazmida sa visokim stepenom prenosivosti (do 10^{-1}). Činjenica da je prikupljeno tako mnogo informacija za tako kratko vreme naglašava značaj sekvenciranja celog genoma i javno dostupnih baza sekvenci (Skov i Monnet, 2016).

Prema podacima Perrin-Guyomard i sar., 2016.godine u Francuskoj, ispitivanje svih izolata sakupljenih u programu Evropske unije za rutinsko praćenje antimikrobne rezistencije kod zoonotskih komensalnih bakterija pokazalo je da je *mcr-1* gen prisutan kod 0,5% izolata *E. coli* poreklom od svinja prikupljenih tokom 2013. godine i kod 5,9% izolata *E. coli* poreklom od ćuraka prikupljenih tokom 2014. godine.

EUCAST je u maju 2016. godine predložio promene graničnih vrednosti MIK za kolistin kod sojeva *P. aeruginosa*. Predlog je da se vrednosti MIK smanje sa osetljiv ≤ 4 mg/L na osetljiv ≤ 2 mg/L i sa rezistentan > 4 mg/L na rezistentan > 2 mg/L. Ovaj predlog je otvoren za komentare do 24.juna 2016.godine.

Davanje antibiotika životinjama koje se koriste za ishranu ljudi ima i drugu svrhu osim terapije, a to su: promocija rasta, profilaksa i metafilaksa (Cabello, 2006). Otprilike 70 % svih antibiotika datih farmским životinjama se koristi u ne terapijske svrhe (Roe i Pillai, 2003).

Upotreba antibiotika u stočarstvu je dugi niz godina u stvari aktivno izdvajala bakterije koje poseduju gene sposobne da stiču otpornost na antibiotike (Sundin i sar., 1995). Shodno tome, ovaj aspekt je sa dosta pažnje obrađen u literaturi. Uprkos velikim razlikama u metodologiji, rezultati najrelevantnijih naučnih istraživanja pokazuju da je nedugo posle uvođenja antibiotika u veterinarsku praksu, primećena otpornost na antibiotike kod patogenih bakterija i/ili fekalnoj flori (Cantas i sar., 2013). Posebno povećana pojava patogenih bakterija otpornih na antibiotike je primećena kod članova rodova *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Escherichia coli*. Neki sojevi ovih rodova koji pokazuju otpornost na antibiotike se, pre svega, prenose među životinjama ali mogu posledično inficirati i ljude kao zoonotski agensi (Giguère i sar., 2007).

Zato što stres snižava funkcije imunog sistema životinja, antibiotici su viđeni kao posebno korisni u intenzivnim uslovima proizvodnje životinja (Halverson, 2000). Neterapijska upotreba antibiotika uključuje stalno izlaganje bakterijske populacije niskom nivou antibiotika davanim u hrani u dugom vremenskom periodu. A to je

optimalan način povećanja otpornosti bakterijske populacije na antibiotike (Alexander i sar., 2011; Gullberg i sar., 2011).

2.13. Akvakultura

Akvakultura/ribarstvo (ribe, školjke i proizvodnja škampa) se ubrzano razvija u poslednjoj deceniji i postaje izuzetno važan izvor hrane za ljude (FAO, 2014). Bakterije patogene za ribe često dovode do razarajućih infekcija na ribnjacima gde je gusta populacija riba u intenzivnom uzgoju. Proizvodnja riba, rakova i školjki na Mediteranu povećana je sa ukupnih 90 000 t 1985.godine na 436 401 tonu 2008. godine (Grigorakis i Rigos 2011). Izvoz salmonida gajenih u ribnjacima iz Čilea porastao je otprilike sa 200 000 tona tokom 2000.godine na skoro 400 000 tona u 2007.godini (Cabello i sar. 2013). Proizvodnja panagasius soma u Vijetnamu se povećala sa nekoliko tona tokom 1990. godine na više od 400 000 t 2010. godini (Rico i sar. 2013). Kina je jedna od najvećih proizvođača hrane poreklom iz vode gde se dve trećine proizvodnje zasniva na akvakulturi (Cao i sar. 2015).

Iako se moderno ribarstvo oslanja više na vakcinaciju i poboljšanje upravljanja (tehnologije gajenja) da bi se izbegle infekcije (Midtlyng i sar., 2011), i dalje se mnoge bakterijske infekcije riba tretiraju upotrebom antibiotika putem hrane ili u lekovitim kupkama. Lekovi koji su najviše u upotrebi su fluorohinoloni, florfenikol, oksitetraciklin i sulfonamidi (Cabello, 2006; Soonthornchaikul i Garelick, 2009). Do sada, većina bakterija koje su patogene za ribe sa ribnjaka sa istorijom infekcija su razvile otpornost na antibiotike (Farmed Fish Health Report, 2010; Shah i sar., 2012a). Najinteresantniji je način korišćenja đubriva životinjskog porekla u svrhu gajenja riba u zemljama jugoistočne Azije. Naime, u ovim zemljama je karakteristično da se iznad vodenih površina u kojima se gaje ribe podižu kavezi u kojima se gaje pilići i svinje (Wing i sar., 2015). Profilaktički, živini i svinjama daju se visoke doze antibiotika, a životinje iz kaveza defeciraju direktno u ribnjake. Time se postižu dva cilja: ribe imaju na raspolaganju uvek dovoljno hrane; izlivene fekalije podstiču rast planktona koji takođe služe za ishranu riba. (Hoa i sar., 2011; Shah i sar., 2012b).

Na ovaj način se sve multirezistentne patogene i nepatogene bakterije kao i geni rezistencije diseminiraju u organizam riba koje se kasnije, u zamrznutom stanju ili u obliku prerađevina izvoze u zemlje Evrope ili SAD.

Prijavljeno je da rezidue antibiotika prisutne u otpadu poreklom od živine i drugih farmskih životinja stvaraju jak selektivni pritisak na selekciju gena odgovornih za otpornost bakterija na antibiotike, povećavajući kompleksnost prenosa bakterija i njihove otpornosti između stoke i vodene sredine (Hoa i sar., 2011; Shah i sar., 2012b).

Morska sredina se može smatrati rezervoarom rezistencije na antibiotike, i u budućnosti treba nastaviti sa praćenjem riba grabljivica. Morske ribe grabljivice mogu poslužiti kao važni pokazatelji, pošto su dugoživeće i spororastuće, i stoga, su potencijalno dugo izložene bakterijama koje su otporne na antibiotike a nalaze se u okeanu. Kao dodatak, ovi podaci podržavaju hipotezu prethodnog rada da je otpornost bakterija na antibiotike prisutna kod morskih vrsta poreklom od više različitih lanaca ishrane kao i različitih staništa (Blackburn i sar., 2010). S obzirom da ishrana ribom ostaje važna komponenta u ljudskoj ishrani, ove informacije se mogu koristiti da bi se utvrdio zoonotski zdravstveni rizik.

Godišnje se životinjama u poljoprivrednom sektoru širom sveta daju ogromne količine lekova da bi se osigurala dovoljna količina hrane (mesa, jaja i mlečnih proizvoda) za brzo rastuću populaciju ljudi. Pošto prikupljanje podataka o upotrebi antibiotika kod životinja nije usklađeno i ne može da obezbedi pouzdane i uporedive informacije, po zahtevu European Commission the European Medicines Agency (EMA), formiran je program the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESVAC). ESVAC program je odgovoran za prikupljanje, analiziranje i prezentovanje podataka iz evropskih zemalja kao i za razvoj organizovanog pristupa za prikupljanje i izveštavanje podataka o korišćenju antibiotika kod životinja uključujući i godišnje izveštavanje od strane država članica evropske unije (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp). Tokom 2007., u 10 evropskih zemalja prodaja antibiotika u terapijske svrhe za upotrebu u veterinarskoj medicini varirala je od 18 do 188 mg/kg biomase (Grave i sar., 2010).

U Evropskoj Uniji upotreba avoparacina je zabranjena 1997. godine, a spramicin, tilozin i virginiamicin kao promotori rasta su zabranjeni za upotrebu 1998. godine. Svi drugi promotori rasta u hrani životinja za ishranu ljudi su zabranjeni u zemljama članicama evropske Unije od 01.01.2006.godine (<http://europa.eu>). Podaci iz Danske pokazuju da životinje mogu biti proizvedene u velikim količinama i bez

upotrebe promotora rasta (Aarestrup i sar., 2001; Aarestrup, 2005; Hammerum i sar., 2007). Norveška industrija ribarstva/akvakulture je proizvela preko milion tona ribe sa ribnjaka (http://www.ssb.no/fiskeoppdrett_en/) koristeći samo 649 kg antibiotika u 2011. (NORM/NORM-VET, 2011).

U Sjedinjenim američkim državama, političari raspravljaju o uvođenju slične zabrane upotrebe antibiotika u stočarstvu kao promotora rasta (<http://www.govtrack.us/congress/bills/109/s742>).

Uprkos ovim zabranama, u nekim delovima sveta, antibiotici bitni za humanu medicinu se i dalje rutinski profilaktički dodaju u hranu životinjama namenjenim za ishranu ljudi da bi se povećao profit i za odbranu od potencijalnih bakterijskih infekcija koje mogu da nastanu usled stresa zbog gustog nasada kako na farmskim tako i u ribnjačkim ekosistemima (Cabello, 2006; Smith i sar., 2009; Ndi i Barton, 2012).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu podataka iz literature kao i sopstvenih preliminarnih istraživanja postavljeni cilj obuhvatao je da se iz organizma klinički zdravih riba koje potiču iz različitih sredina (ribnjaci, akvarijumi, riblje pijace) izvrši izolacija bakterija koje su sastavni deo mikrobioma kože, škrge i creva riba i da se zatim ispita osetljivost ovih bakterija na određeni broj antibiotika koji se koriste u veterinarskoj i humanoj medicinskoj praksi. Takođe, cilj je bio da se primenom određenih klasičnih i savremenih molekularnih metoda u mikrobiološkim istraživanjima utvrdi prisustvo gena rezistencije, njihova lokalizacija (na hromozomu ili na mobilnim genetičkim elementima). Za gene za koje se utvrdi da su lokalizovani na plazmidima, planirano je istraživanje konjugabilnosti (prenosivosti) tih plazmida.

Kako bi se ostvarili postavljeni ciljevi, određeni su i zadaci istraživanja koji su obuhvatali:

- Izolaciju sojeva bakterija koji su sastavni deo mikrobioma škrge, kože i creva akvarijumskih riba (gupi, *Poecilia reticulata*), ribnjačkih riba i riba sa ribljih pijaca (šaran, *Cyprinus carpio*).
- Tačnu identifikaciju izolovanih sojeva konvencionalnim mikrobiološkim metodama, poluautomatskim identifikacionim sistemima, molekularnim metodama (PCR, sekvenciranje gena za 16S rRNK) kao i fizičko-hemijskim savremenim metodama (MALDI-TOF).
- Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva bakterija na određeni broj antibiotika.
- Ispitivanje prisustva različitih gena rezistencije primenom molekularnih metoda (PCR).
- Izolacija plazmida iz sojeva bakterija kod kojih su nađeni geni rezistencije i određivanje veličine plazmida.
- Konjugacija plazmida *in vitro* u cilju utvrđivanja prenosivosti detektovanih gena rezistencije.
- Transformacija *in vitro* u kompetentne ćelije u cilju utvrđivanja prenosivosti detektovanih gena rezistencije.
- Analiza dobijenih rezultata

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Sojevi bakterija koji su ispitivani

Sojevi bakterija koji su ispitivani bili su izolovani iz uzoraka poreklom od šarana (*Cyprinus carpio*) sa 6 različitih šaranskih ribnjaka koji se vodom snabdevaju iz tri različita vodena toka (reke Tisa, Sava i Dunav) na teritoriji Vojvodine kao i od šarana iz ribarnica na beogradskim pijacama. Iz 3 ribarnice uzimano je po 10 riba od kojih su pored briseva škrge, kože i rektalnih briseva uzimani i uzorci creva, jetre i slezine kada je riba pripremana za potrošače. Sa svakog ribnjaka uzimani su uzorci od 35 riba različitih starosnih kategorija i iz različitih objekata. Uzorkovanje materijala za ispitivanje vršeno je od zdravih konzumnih, živih riba. RIBE nisu bile žrtvovane ni povređivane. Uzimani su brisevi kože, škrge i rektalni brisevi. Uzorkovanje je vršeno dvokratno u vremenskom periodu proleće/leto i jesen/zima 2011/2012. godine. Ukupno je uzorkovano 240 šarana. Paralelno sa ovim uzorkovanjem, uzimani su i uzorci od akvarijumskih riba (samo vrsta gupi, *Poecilia reticulata*), ukupno 10 gupi riba iz nekoliko različitih akvarističkih prodavnica koje su bile nasumično odabirane.

Izolacija je vršena na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Katedri za Mikrobiologiju u laboratoriji za Bolesti riba.

Za dalje ispitivanje odabirane su samo Gram-negativne vrste zbog ispitivanja njihove osetljivosti na antibiotike koji su značajni u humanoj, a delom i u veterinarskoj kliničkoj praksi, a to su penicilini sa inhibitorima beta laktamaza (amoksicilin sa klavulanskom kiselinom), karbapenemi (imipenem, meropenem), aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin, amikacin), ureidopenicilini bez i sa inhibitorima beta laktamaza (piperacilin, piperacilin sa tazobaktamom) i cefalosporini III I IV generacije (ceftazidim, cefepim).

4.2. Izolacija i identifikacija primenom konvencionalnih metoda

Za izolaciju sojeva bakterija primenjene su konvencionalne mikrobiološke metode.

Zasejavanje briseva i organa vršeno je na UTI agaru (Urogenital tract infections chromogenic agar, HI Media, India) odakle su čiste kulture presejavane i održavane na Columbia blood agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi (bioMerieux, France). Podloge su

inkubirane na temperaturi od 27°C. Svi izolovani sojevi su ispitivani testom oksidaze primenom oksidaza reagensa (Becton Dickinson, USA). Dijagnostičko ispitivanje osetljivosti na sulfametoksazol sa trimetoprimom i imipenem kod ispitivanih sojeva vršeno je primenom disk difuzione metode na Mueller Hinton agaru (Becton Dickinson, USA) sa diskovima proizvođača Becton Dickinson, kao i primenom E test traka istih antibiotika (bioMérieux, Francuska), u cilju određivanja vrednosti MIK, takođe na Mueller Hinton agaru. Procedura izvođenja, priprema suspenzije ispitivanih sojeva, odabir podloga, načini inokulacije, režimi inkubacije, očitavanje i interpretacija rezultata vršeni su na osnovu preporuka CLSI i EUCAST (2015).

S obzirom na značajnu stečenu rezistenciju *Pseudomonas* vrsta kao i na intrinzičnu rezistenciju *Stenotrophomonas* vrsta neophodno je jasno razlikovati ove rodove. Problem u dijagnostici obično predstavljaju i *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* i *Stenotrophomonas maltophilia* (nekada *Pseudomonas maltophilia*), kao i pripadnici roda *Acinetobacter* koji su svi zajedno često prisutni u uzorcima poreklom od riba, a ne proizvode pigmente i imaju identične osobine u primarnoj identifikaciji (gram-negativni štapići, oksidaza pozitivni, rastu na MacConkey agaru, imaju oksidativni tip metabolizma, itd). Preliminarna identifikacija izolovanih sojeva vršena je primenom API 20 NE stripa (bioMérieux, Francuska). Međutim po podacima iz literature rezultati nisu dovoljno pouzdani čak ni kada daju „izvršna“ „vrlo dobra“ ili „dobra identifikacija“ pošto ovakvi sistemi pokazuju visok nivo grešaka u razlikovanju *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* vrsta (Wellington N i sar. 2005). Zato su u identifikaciji izolata korišćene i metode: standardne lančane reakcije polimeraze (PCR), sekvenciranje gena za 16S rRNA, masene spektrometrije (MALDI-TOF), na aparatima Vitek MS (bioMérieux Industry, Francuska) i MALDI TOF/TOF 4800 Plus (AB SCIEX, USA).

4.3. Identifikacija primenom metode standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Ekstrakcija DNK primenom protokola referentne laboratorije EU (metoda kuvanja na 100°C): Sojevi su zasejavani na krvni agar i ploče su inkubirane tokom 16-18 časova na temperaturi od 27°C. Sipan je po 1ml PBS (Dulbecco's, Sigma Aldrich, USA) (Phosphate buffer saline; pH 7,4) u svaku epruveticu od 1,5 ml za centrifugiranje,

a zatim je svaka kultura uzeta ezom od 10 μ l suspendovana u PBS i vorteksirana. Centrifugiranje je vršeno tokom 5 minuta na 13200 rpm, a zatim su odbacivani supernatanti. Talog svakog uzorka je resuspendovan u 100 μ l TE pufera (100x TE, Serva, Germany) (Tris-EDTA 10:1 (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8)). Korišćenjem vrele igle, pravljene su mali otvori na poklopcima epruveta za centrifugiranje. Zatim su prenošene epruvete za centrifugiranje u plutajući stiropor i kuvane tokom 10 minuta u vodenom kupatilu. Uzorci su potom inkubirani na ledu tokom jednog minuta. U međuvremenu su pripremljene nove epruvete za centrifugiranje sa 900 μ l TE pufera. Dobijene suspenzije su resuspendovane i po 100 μ l je prenošeno u nove epruvete, nakon čega su uzorci čuvani na temperaturi od -20°C . Sekvence, veličine, proizvođači i reference svih korišćenih prajmera nalaze se u tabeli 7.

U cilju preciznog određivanja pripadnosti rodu *Pseudomonas* korišćena je metoda PCR prethodno opisana od Spilker i saradnika 2004. PCR smeša u količini od 25 μ l sastojala se od: 2 mM MgCl_2 , 1 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 0,4 mM, po 0,4 μ M svakog prajmera, 1 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (Thermo Scientific) i 2 μ l DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 4 minuta, 25 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, annealing 54°C tokom 30 sec, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 5 minuta. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P.aeruginosa* ATCC 27853, a kao negativna kontrola *S. maltophilia* ATCC 13637.

Za precizno određivanje pripadnosti ispitivanih sojeva rodu *Stenotrophomonas* korišćena je metoda opisana od strane Gallo i autori 2013. godine. PCR smeša u količini od 25 μ l sastojala se od: 1 mM MgCl_2 , 1 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 0,2 mM, po 0,2 μ M svakog prajmera, 2 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (Thermo Scientific) i 2 μ l DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 5 minuta, 30 ciklusa denaturacije na 95°C 45 sekundi, annealing 55°C tokom 30 sec, ekstenzija 72°C 45 sec i finalna ekstenzija 72°C 10 minuta. Kao pozitivna kontrola

korišćen je soj *S. maltophilia* ATCC 13637 a kao negativna kontrola *P.aeruginosa* ATCC 27853.

4.4. Izolacija i karakterizacija bakterijskih izolata 16S rRNK sekvenciranjem

Genomska DNK izolovanih sojeva je ekstrahovana primenom Kapa Express Extract Kit, Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA i 16S ribozomalni RNK (16S rRNK) geni su amplifikovani pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) korišćenjem univerzalnih bakterijskih prajmera 27f i 1492r (Invitrogen) prema protokolu koji je opisao Lane DJ, 1991. Dobijeni PCR produkti sekvencionirani su primenom Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA) i sekvence su analizirane i sastavljene pomoću SeqMan Pro softvera (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). Program BLASTN (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)(Altschul i sar. 1997.) korišćen je za pretragu sličnosti sekvenci.

4.5. Identifikacija primenom metode MALDI-TOF

Za određeni broj izolata izvršena je identifikacija i primenom aparata Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Aparat predstavlja adaptiranu verziju masenog spektrometra Shimadzu AXIMA, koji je zajedno sa novom bazom podataka (MS-ID) optimizovan za mikrobiološke laboratorije. Vitek MS se zasniva na MALDI-TOF MS tehnologiji, koja se godinama koristi za određivanje osobina proteina, a danas je vrlo korisna za identifikaciju mikroorganizama. Masena spektrometrija ima svojstvo da detektuje odnos mase i naboja analizirane biološke materije, obezbeđujući spektar u roku od nekoliko minuta. Mali deo kolonije izolovanog mikroorganizma se nanosi sterilnim štapićem na metalnu pločicu, preko koga se stavlja 1µl matriksa, koji za manje od 5 minuta isušivanja na sobnoj temperaturi kristališu na pločici. Zatim se pločica unosi u aparat gde laser bombarduje mešavinu bakterija i matriksa, pri čemu dolazi do jonizacije proteina i njihovog razdvajanja u električnom polju. Ovi proteini se usmeravaju u vakuum cev i razdvajaju se prema odnosu mase i naboja. Na ovaj način proteini pristižu u detektor u sekvencama koje su obrnuto proporcionalne njihovoj masi stvarajući profil proteina (mass spectral fingerprinting). Glavni pikovi pripadaju ribozomalnim i ostalim većinski zastupljenim proteinima, kao što su HSP (heat shock proteini), DNK vezujući proteini i RNK šaperoni. Sastav matriksa pomaže da se još više

obogati signal osnovnih proteina, kao što su ribozomalni. Nakon toga se dobijeni profil analizira i poredi sa bazom podataka, što omogućava preciznu identifikaciju mikroorganizama. Svaki komercijalni sistem koji funkcioniše primenom MALDI-TOF MS tehnologije koristi različite baze podataka, različite algoritme i različite načine za izveštavanje pouzdanosti dobijene identifikacije. Između identifikacije primenom MALDI-TOF MS i klasičnih metoda postoji visok nivo saglasnosti koji se kreće od 84% do 95%.

Za pripremu ispitujućih sojeva korišćen je VITEK MS-CHCA matrix, (bioMerieux), a za očitavanje rezultata korišćena je baza podataka VITEK MS V2.0 Knowledge Base - Industry Use. Za kalibraciju aparata upotrebljen je soj *E. Coli* ATCC® 8739. Jedan manji broj sojeva je ispitivan, osim na VITEK MS aparatu i na MALDI TOF/TOF 4800 Plus (AB SCIEX, USA). Bakterije su identifikovane pomoću MALDI MS/MS biotipizacijskog protokola opisanog na <http://rapidcell.proteinreader.com/maldi-msms-biotypization-protocol/>.

4.6. Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike u uslovima *in vitro*

Ispitivanje pojave i raširenosti rezistencije kod bakterija poreklom od riba vršeno je na sojevima *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, vrsta kao i na sojevima iz familije *Enterobacteriaceae*.

4.6.1. Disk difuziona metoda

a) Princip metode

Standardizovani inokulum soja bakterije koji je ispitivan, zasejavan je na površinu Muller Hinton agara. Na podlogu se potom postavljaju antibiogram diskovi ili tablete. Zasejane podloge se inkubiraju u termostatu na temperaturi od 27°C. Nakon inkubacije vrši se merenje zone inhibicije rasta bakterija oko svakog diska. Na osnovu uputstva proizvođača diskova ili tableta soj se kvalitativno kategorizuje u jednu od ponuđenih kategorija: osetljiv, intermedijaran, rezistentan.

Metoda je prevashodno namenjena za ispitivanje osetljivosti na antibiotike brzorastućih vrsta bakterija. Za nutricionu zahtevnije vrste koristi se modifikovana MH podloga sa dodatkom 6% ovčije krvi. S obzirom da postoje brojne modifikacije disk difuzione metode od strane raznih nacionalnih komiteta ili čak i proizvođača

antibiogram diskova i tableta, u ovom ispitivanju korišćena je preskripcija metode opisane i preporučene od strane CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) iz 2015. godine.

b) Procedura izvođenja

- Mueller Hinton (MH) agar pripremljen je po uputstvu proizvođača (BioLab). Podloga je razlivana u petrijeve posude promera fi 100 u količini od približno 25 ml kako bi debljina podloge nakon hlađenja i stezanja iznosila približno 4 mm. Razlivena MH podloga čuvana je na temperaturi frižidera. Pre upotrebe podloga je držana na sobnoj temperaturi u trajanju od najmanje 1 h, ili u inkubatoru na temperaturi od 37°C najduže 30 minuta, kako bi ispario višak vlage (kondenz).

- Inokulum je pripremljen po metodi direktnog resuspendovanja kolonija koje se ispituju (postoji i metod pripreme inokuluma iz logaritamske faze rasta bakterija). Soj bakterija koji se ispituje je zasejavan na neselektivnu podlogu (Brain Heart Infusion agar, BioLab) i inkubisan na temperaturi od 27°C 18 do 24^h. Nakon toga je nekoliko kolonija datog soja resuspendovano u 0,9% NaCl radi dobijanja zamućenja inokuluma koje je jednako zamućenju 0,5 standarda McFarland skale, što je odgovaralo ukupnom broju bakterija od približno 1-2x10⁸/ml. U ispitivanjima je korišćen gotov (kupljen) McFarland 0,5 standard (Becton Dickinson).

- Inokulacija pripremljene suspenzije soja koji se ispituje na površinu MH podloge vršena je primenom sterilnog brisa. Bris je najpre potapan u suspenziju, a zatim je okretanjem i pritiskanjem brisa uz unutrašnju ivicu epruvete oceden višak tečnosti. Potom se brisem tri puta prelazilo preko cele površine MH podloge, cik-cak potezima. Pre aplikacije diskova zasejana podloga je ostavljena na sobnu temperaturu 15 minuta da bi se prosušila.

- Postavljanje diskova antibiotika vršeno je upotrebom poluautomatskog dispenzera. U ispitivanjima su korišćeni antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson.

Za ispitivanje osetljivosti *Pseudomonas* vrsta upotrebljeni su diskovi piperacilina (100 µg), piperacilina sa tazobaktamom (100/10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), amikacina (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), kolistina (10 µg), fosfomicina (200 µg) i polimiksinaB (300 U).

Za ispitivanje osjetljivosti *Stenotrophomonas* vrsta upotrebljeni su diskovi sulfametoksazola sa trimetoprimom (23.75/1.25 µg), ciprofloksacina (5 µg), hloramfenikola (30 µg), ceftazidima (30 µg) i polimiksinaB (300 U).

Za ispitivanje osjetljivosti *Aeromonas* vrsta upotrebljeni su diskovi ciprofloksacina (5 µg), hloramfenikola (30 µg), sulfametoksazola sa trimetoprimom (23.75/1.25 µg), ceftazidima (30 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina sa tazobaktamom (100/10 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), streptomicina (10 µg), tetraciklina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg), amikacina (30 µg), kolistina (10 µg), polimiksina B (300 U), nalidiksične kiseline (30 µg) i nitrofurantoina (300 µg).

Za ispitivanje osjetljivosti *Acinetibacter* vrsta upotrebljeni su diskovi ceftriaksona (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), sulfametoksazola sa trimetoprimom (23.75/1.25 µg), hloramfenikola (30 µg), ceftazidima (30 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina sa tazobaktamom (100/10 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), tetraciklina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg) i amikacina (30 µg)

Za ispitivanje osjetljivosti bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* upotrebljeni su diskovi ampicilina (10 µg), amoksicilina sa klavulanskom kiselinom (20/10 µg), cefepima (30 µg), ceftriaksona (30 µg), ceftazidima (30 µg), tetraciklina (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), hloramfenikola (30 µg), sulfametoksazola sa trimetoprimom (23.75/1.25 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina sa tazobaktamom (100/10 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), tobramicina (10 µg), kanamicina (10 µg), streptomicina (10 µg), fosfomicina (200 µg), nitrofurantoina (300 µg), i nalidiksične kiseline (30 µg).

Izbor antibiotika bazirao se na preporukama CLSI i EUCAST iz 2015.godine. Inkubacija inokulisanog MH agara sa diskovima trajala je 16 do 18^h na temperaturi 27°C.

c) Očitavanje rezultata

Očitavanje i interpretacija rezultata vršeni su prema uputstvu CLSI. Na osnovu dobijenih vrednosti u milimetrima svaki soj je bio kategorizovan u kvalitativnu interpretativnu kategoriju: osjetljiv (S), intermedijarn (I) ili rezistentan (R).

d) Kontrola kvaliteta disk difuzione metode

Za kontrolu kvaliteta MH podloge, antibiogram diskova i provere postojanja eventualnih grešaka u izvođenju procedure korišćeni su sledeći referenti sojevi bakterija:

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
3. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- Sastav Mueller Hinton agara može značajno da varira prilikom proizvodnje svake nove serije podloge (bez obzira na proizvođača). Najznačajnije je bilo proveriti količinu timidina i jona Ca^{2+} i Mg^{2+} . Timidin može da utiče na vrednosti zona inhibicije rasta za sulfametoksazol sa trimetoprimom. U cilju provere toga da li se timidin nalazio u višku u korišćenoj podlozi upotrebljen je soj *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Procedura pripreme inokuluma bila je identična napred opisanoj proceduri, a na zasejanu MH podlogu sa sojem *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 postavljan je samo disk sulfametoksazola sa trimetoprimom. Zona inhibicije morala je iznositi ≤ 20 mm što je bio znak da je količina timidina u podlozi zadovoljavajuća.

- Povećana ili smanjena količina jona Ca^{2+} i Mg^{2+} ometa procenu rezultata osetljivosti sojeva *Pseudomonas aeruginosa* na tetraciklin i aminoglikozide. Ako je količina jona Ca^{2+} i Mg^{2+} povećana dolazi do lažnog smanjenja zona inhibicije rasta sojeva *P.aeruginosa* oko diskova aminoglikozidnih antibiotika. Suprotno od toga, smanjena količina jona Ca^{2+} i Mg^{2+} dovodi do lažnog povećanja zone inhibicije rasta sojeva *P.aeruginosa* oko diskova tetraciklina. Količina jona Ca^{2+} i Mg^{2+} indirektno je proveravana upotrebom soja *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Primenom istog soja vršena je provera i vrednosti pH podloge koja se često menja tokom stajanja na tameperaturi frižidera. Promena vrednosti pH podloge može se primetiti drastičnim smanjenjem ili povećanjem zone inhibicije rasta *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oko diska ciprofloksacina (u zavisnosti od toga da li je pH suviše nizak ili visok). Inokulum je pripreman po napred opisanoj proceduri, zasejavanje takođe, a na MH podlogu postavljeni su samo diskovi tetraciklina, gentamicina, amikacina i ciprofloksacina. Očitavanje je vršeno na osnovu vrednosti zona inhibicije za referentne sojeve date u preporukama CLSI, a prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Optimalne vrednosti zona inhibicije rasta *P.aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 za kontrolu kvaliteta MH podloge u disk difuzionoj metodi na pojedine antibiotike

Antibiotik	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Optimalna zona inhibicije u mm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Optimalna zona inhibicije u mm
Tetraciklin 30 µg	≤20	-
Gentamicin 10 µg	-	16-21
Amikacin 30 µg	-	18-26
Ciprofloksacin 5 µg		25-33

- Provera svih drugih mogućih nedostataka u podlozi ili grešaka u proceduri izvođenja metode vršena je primenom soja *E.coli* ATCC 25922. Priprema inokuluma i zasejavanje soja *E.coli* ATCC 25922 vršeno je prema već opisanim procedurama. Na MH podlogu postavljani su svi diskovi namenjeni za izvođenje istraživanja sa kliničkim sojevima, a vrednosti zona inhibicije rasta soja *E.coli* ATCC 25922 morale su za svaki upotrebljeni antibiotik da odgovaraju zonama preporučenim od strane CLSI.

4.6.2. E test

a) Princip metode

Standardizovan inokulum soja bakterije koji se ispituje zasejava se na površinu Mueller Hinton agara. Epsilon (E) test trake koje sadrže antibiotik nanosen u gradijentu koncentracije, postavljane su na površinu zasejane podloge, a zatim su podloge inkubisane. Nakon inkubacije, dobija se zona inhibicije rasta elipsoidnog oblika čija veličina zavisi od aktivnosti odnosno delovanja antibiotika. Vrednost MIK se očitava na mestu gde se vidljivi rast bakterija i E test traka dodiruju. Na osnovu očitane vrednosti MIK i upoređivanjem te vrednosti sa graničnim vrednostima propisanim od strane CLSI, soj se svrstava u neku od interpretativnih kategorija (S, I, R). Upotrebljeni E test (bioMerieux, Francuska) je komercijalni (kupovni) proizvod i proizvodnja E test traka nije izvršena na osnovu uputstava CLSI već na osnovu patentirane procedure koju je

razvila proizvođačka kuća. Prilikom interpretacije rezultata treba se držati i uputstava proizvođača.

b) Procedura izvođenja

Referentna podloga za ovu metodu je Mueller Hinton agar (za ispitivanje sojeva iz ovog istraživanja). Podloga je pripravljena prema uputstvu proizvođača (BioMerieux). Inokulum je pripreman prema identičnoj proceduri kao za disk difuzionu metodu. Zasejavanje inokuluma na podlogu takođe je rađeno kao u disk difuzionoj metodi. Nakon 15 minuta stajanja na sobnoj temperaturi radi prosušivanja, na svaku podlogu su bile postavljene po dve E test trake, dakle, po dva antibiotika na svakoj ploči. Trake su morale da budu postavljene paralelno jedna pored druge, ali u međusobno obrnutim pravcima, jedna okrenuta naniže, druga obrnuto-naviše. U ispitivanjima je upotrebljen E test proizvođača (BioMerieux, Francuska) i to trake sledećih antibiotika: piperacilin (0.016-256 µg/ml), piperacilin sa tazobaktamom (0.016-256 µg/ml), ceftazidim (0.016-256 µg/ml), imipenem (0,002-32 µg/ml), ciprofloksacin (0,002-32 µg/ml), cefepim (0.016-256 µg/ml), hloramfenikol (0.016-256 µg/ml), sulfametoksazol sa trimetoprimom (0,002-32 µg/ml), kolistin (0.016-256 µg/ml), fosfomicin (0.064-1024 µg/ml) i polimiksin B (0.064-1024 µg/ml). Trake antibiotika nisu smele biti dodirivane na delu gde je bio nanešen antibiotik. Jednom postavljena traka više se nije smela pomerati jer se antibiotik razliva. Inkubacija je trajala 18-24^h na temperaturi od 27°C.

c) Očitavanje rezultata

Iako je E test veoma jednostavan za izvođenje (za razliku od svih drugih metoda određivanja vrednosti MIK antibiotika), očitavanje rezultata kod ove metode je veoma komplikovano i podložno velikim subjektivnim greškama prilikom interpretacije rezultata. Proizvođač BioMerieux je sa uputstvom za upotrebu E testa priložio i seriju od 25 fotografija sa diskutabilnim ili čak i paradoksalnim rezultatima koji se veoma često javljaju u radu, kao i iscrpno objašnjenje kako te rezultate treba tumačiti. Za vrednosti MIK uzimane su vrednosti zabeležene na traci antibiotika na onom mestu odakle je počinjao vidljivi porast bakterija.

d) Kontrola kvaliteta

Kao i kod prethodno opisanih metoda, i ovde se koriste referentni sojevi *E.coli* ATCC 25922 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Inokulumi za zasejavanje ovih sojeva pripremani su kao i kod disk difuzione metode kao i zasejavanje inokuluma.

Granične vrednosti MIK za E test date su uputstvu proizvođača i one odgovaraju graničnim vrednostima MIK koje su propisane od strane CLSI za dilucioni metod u agaru, a koje se opet ne razlikuju od graničnih vrednosti MIK za dilucioni metod u bujonu.

4.6.3. Fenotipska metoda otkrivanja prisustva KPC karbapenemaza, metalo beta laktamaza (MBL), AmpC i OXA-48 beta laktamaza pomoću Rosco Diagnostica tableta

Fenotipske metode za otkrivanje mehanizama antimikrobne rezistencije među Gram negativnim bakterijama, su lake za izvođenje, tumačenje i uvođenje u rutinski rad kliničkih laboratorija. Ove metode se mogu koristiti za potvrđivanje prisustva karbapenemaza i drugih beta laktamaza.

4.6.3.1. KPC/MBL i OXA-48 potvrdni test

a) Princip metode

Rosco Diagnostica KPC/MBL i OXA-48 potvrdni fenotipski test za otkrivanje karbapenemaza KPC/ MBL i OXA-48 kod *Enterobacteriaceae* (Rosco Diagnostica, Danska) i sastoji se od 5 tableta: tableta A sadrži meropenem 10 µg, tableta B sadrži meropenem 10 µg i fenilbornu kiselinu (KPC i AmpC inhibitor), tableta C sadrži meropenem 10 µg i kloksacilin (AmpC inhibitor), tableta D koja sadrži meropenem 10 µg i dipikolinsku kiselinu (MBL inhibitor) i tableta E sadrži temocilin 30 µg (OXA-48).

Ako soj pokazuje smanjenu osetljivost na karbapeneme moguća su 4 razloga:

1. Soj hiper proizvodi AmpC. Zbog spore hidrolize karbapenema pomoću AmpC enzima, AmpC je verovatno u vezi sa drugim mehanizmima rezistencije kao što su eflux pumpe, gubitak porina ili drugih beta laktamaza AmpC enzimi su inhibirani kloksacilinom. Kloksacilin se koristi za razlikovanje AmpC i KPC pošto su oba inhibisana fenilbornom kiselinom. Tako da je razlika u zoni inhibicije ≥ 5 mm između meropenema i meropenema sa kloksacilinom pokazatelj AmpC aktivnosti.

2. Soj proizvodi metalo beta laktamaze koje hidrolizuju karbapeneme uspešno. MBL enzime inhibiše dipikolinska kiselina i razlika u zoni inhibicije ≥ 5 mm između meropenema i meropenema sa dipikolinskom kiselinom ukazuje na prisustvo MBL.

Dipikolinska kiselina nema (za razliku od EDTA) intrinzičnu antimikrobnu aktivnost i stoga je rezultate mnogo lakše tumačiti.

3. Soj produkuje KPC enzime. KPC enzime inhibira fenilborna kiselina. Međutim, fenilborna kiselina inhibira i AmpC i u cilju da se poveća specifičnost ove metode, uključena je i kombinacija sa kloksacilinom da bi se lakše razlikovali. Tako da razlika u zoni inhibicije oko meropenem diska ≥ 4 mm u odnosu na zonu inhibicije oko diska meropenema sa fenilbornom kiselinom ali i razlika < 4 mm u odnosu na zonu inhibicije oko meropenema sa kloksacilinom ukazuje na prisustvo KPC enzima.

4. *Enterobacteriaceae* proizvode oksacilinaze (OXA-48 ili slične). Negativan rezultat svih sinergističkih testova i nedostatak zone inhibicije oko temocilina 30 μg ukazuje na OXA-48 ili slične enzime. Osim toga, ovakvi sojevi su visoko rezistentni na piperacilin sa tazobaktamom. Napomena: ako nema zone inhibicije oko meropenema i svih drugih kombinacija test sa temocilinom nije validan i ne može se izvesti zaključak. Test temocilinom je samo za sojeve koji pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*.

b) Procedura izvođenja

- Od sveže i čiste prekonocne kulture nekoliko kolonija se resuspenduje u 0,9% NaCl radi dobijanja zamućenja inokuluma koje je jednako zamućenju 0,5 standarda McFarland skale, što odgovara ukupnom broju bakterija od približno $1-2 \times 10^8/\text{ml}$. U ispitivanjima je korišćen gotov (kupljen) McFarland 0,5 standard (Becton Dickinson).
- Inokuliše se sterilnim brisom na ploču Miler Hinton agara.
- Postave se tablete tako da ima dovoljno prostora među diskovima da može da se očita zona inhibicije.
- Inkubira se na $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 18-24^h.
- Mere se i beleže prečnici zone inhibicije. Ako nema zone oko diska to odgovara veličini zone inhibicije od 9 mm.

c) Očitavanje rezultata

Rezultati se tumače poređenjem zona inhibicije oko različitih tableta:

- Porede se zone inhibicije oko tablete A sa zonama inhibicije svake meropenem+inhibitor tablete. Ako su sve zone 3 mm jedne od drugih, beleži se da soj nema ni KPC ni MBL aktivnost.

- Izmere se zone inhibicije oko meropenem diska i uporediti je sa zonom inhibicije oko meropenema sa kloksacilinom ali i meropenema sa fenilbornom kiselinom: Ako je zona oko diska sa kloksacilinom ≥ 5 mm i zona oko diska sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm u poređenju sa čistim meropenemom soj pokazuje samo AmpC aktivnost. Ali ako je zona oko meropenema sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm i zona oko meropenema sa kloksacilinom ≤ 3 mm u poređenju sa čistim meropenemom soj pokazuje KPC aktivnost. I/ili se porede zone oko diskova sa inhibitorima: ako je zona oko meropenema sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm od zone oko meropenema sa kloksacilinom soje je KPC pozitivan.
- Izmeri se zona oko meropenem diska i diska meropenema sa dipikolinskom kiselinom: ako je zona oko meropenema sa dipikolinskom kiselinom ≥ 5 mm u poređenju sa zonom oko čistog meropenema soj ima MBL aktivnost. **Testiraju se samo ceftazidim rezistentni izolati.** Lažno pozitivni rezultati mogu biti kod ceftazidim osetljivih izolata.
- Neki izolati pokazuju meropenem MIK $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ (zona inhibicije oko meropenem 10 μg > 25 mm) mogu da proizvode karbapenemaze (metalo beta laktamaze VIM-1 ili slične) koji se teško otkrivaju ovim KPC/ MBL potvrdnim kitom. Da bi se otkrili ovi sojevi treba koristiti imipenem 10 μg i meropenem 10 μg a između njih postaviti disk sa dipikolinskom kiselinom sa razmakom od 10 mm od ivice diska do ivice diska. Sinergizam između ovih diskova ukazuje na MBL aktivnost.
- Izmeri se zona oko temocilin tablete. Ako nema zone inhibicije smatra se da je soj OXA-48 ili slično pozitivan. U oko 80% slučajeva OXA-48 je u pratnji CTX-M i ESBL. Može biti otkriven postavljanjem diskova ceftazidima sa klavulanskom kiselinom ili meropenema sa tazobaktamom.
- Moguće je da je soj pozitivan na više od jednog mehanizma rezistencije. Tako na primer, ako je zona oko meropenema sa dipikolinskom kiselinom ≥ 5 mm u poređenju sa zonom oko čistog meropenema ali i ako je zona oko meropenema sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm u poređenju sa zonom oko čistog meropenema soj je pozitivan i na MBL i na KPC aktivnost. Mada u nekoliko slučajeva MBL može da maskira prisustvo KPC čineći ga tako

težim za otkrivanje u prisustvu MBL enzima. Ni jedna kombinacija mehanizama rezistencije nije nemoguća.

U tabeli 2 su ukratko prikazani mogući ishodi ovog testa.

Tabela 2. Interpretacija rezultata fenotipskog ispitivanja prisustva cefalosporinaza, beta laktamaza proširenog spektra dejstva i karbapenemaza

		Meropenem sa fenilbornom kiselinom	Meropenem sa dipikolinskom kiselinom	Meropenem sa kloksacilinom	Temocilin 30 µg
AmpC + gubitak porina	Meropenem 10 µg	≥4 mm	≤3 mm	≥5 mm	≥12 mm
ESBL+gubitak porina (a)	Meropenem 10 µg	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	≥12 mm
KPC	Meropenem 10 µg	≥4 mm	≤3 mm	≤3 mm	varira
	Meropenem sa kloksacilinom	≥4 mm	/	/	/
MBL	Meropenem 10 µg	<4 mm	≥5 mm	≤3 mm	varira
OXA-48 i slični	Meropenem 10 µg	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	Nema zone inhibicije
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 µg	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	Nema zone inhibicije

(a): sinergizam ceftazidim sa klavulanskom kiselinom

Soj ne pokazuje ni AmpC, KPC ni MBL aktivnost: sve zone su 3 mm jedne od drugih.

4.6.3.2. KPC/ MBL potvrdni test za *P.aeruginosa/Acinetobacter*

a) Princip metode

Rosco Diagnostica KPC/ MBL potvrdni fenotipski test za otkrivanje karbapenemaza KPC/ MBL kod *P.aeruginosa/Acinetobacter* (Rosco Diagnostica, Danska) sastoji se od 5 tableta: tableta A sadrži imipenem 10 µg, tableta B sadrži imipenem 10 µg i fenilbornu kiselinu (KPC i AmpC inhibitor), tableta C sadrži imipenem 10 µg i kloksacilin (AmpC inhibitor), tableta D koja sadrži imipenem 10 µg i dipikolinsku kiselinu (MBL inhibitor) i tableta E sadrži imipenem 10 µg sa EDTA.

Smanjena osetljivost na karbapeneme je kada:

1. Soj proizvodi metalo beta laktamaze koje hidrolizuju karbapeneme uspešno. MBL enzime inhibiše dipikolinska kiselina i EDTA. Sinergija između imipenema sa dipikolinskom kiselinom i/ili EDTA ukazuje na prisustvo MBL.

2. Sinergija između imipenema i imipenema sa dipikolinskom kiselinom je delimično korisna kada izolat ne pokazuje zonu inhibicije oko diska imipenema 10 µg.

3. Soj proizvodi KPC enzime. KPC enzime inhibira fenilborna kiselina. Međutim, fenilborna kiselina inhibira i AmpC i u cilju povećanja specifičnosti ove metode, uključena je i kombinacija sa kloksacilinom da bi se lakše razlikovali. Tako da postojanje razlike u zoni inhibicije oko imipenema sa fenilbornom kiselinom ali ne i postojanje razlike u zoni inhibicije oko imipenema sa kloksacilinom ukazuje na prisustvo KPC enzima.

4. Sinergističko delovanje dipikolinske kiseline se poboljšava upotrebom MacConkey agara umesto Miler Hinton agara. Tako da se ovi testovi izvode na MacConkey agaru.

b) Procedura izvođenja

- Od sveže i čiste prekončne kulture nekoliko kolonija se resuspenduje u 0,9% NaCl radi dobijanja zamućenja inokuluma koje je jednako zamućenju 0,5 standarda McFarland skale, što odgovara ukupnom broju bakterija od približno $1-2 \times 10^8$ /ml. U ispitivanjima je korišćen gotov (kupljen) McFarland 0,5 standard (Becton Dickinson).
- Inokuliše se sterilnim brisom na ploču **MacConkey agara**.
- Postave se tablete tako da ima dovoljno prostora među diskovima da može da se očita zona inhibicije.
- Vodi se računa da se diskovi imipenema i imipenema sa dipikolinskom kiselinom postave na rastojanju 5 mm od ivice do ivice diska kada izolati ne pokazuju zonu inhibicije oko imipenema 10 µg.
- Inkubira se na $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 18-24^h.
- Mere se i beleže prečnici zone inhibicije. Ako nema zone oko diska to odgovara veličini zone inhibicije od 9 mm.

- Zabeleži se prisustvo ili odsustvo sinergizma između imipenema i imipenema sa dipikolinskom kiselinom, kada izolat ne pokazuje zonu inhibicije (9 mm) oko imipenema 10 µg.

c) Očitavanje rezultata

Rezultati se tumače poređenjem zona inhibicije oko različitih tableta.

- Izmeri se zona inhibicije oko imipenem 10 µg diska i uporediti je sa zonom inhibicije oko imipenema sa kloksacilinom ali i imipenema sa fenilbornom kiselinom: Ako je zona oko diska imipenema sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm i zona oko diska imipenema sa kloksacilinom < 3 mm u poređenju sa čistim imipenemom soj pokazuje KPC aktivnost. Porede se zone oko kombinovanih diskova: ako je zona inhibicije oko imipenema sa fenilbornom kiselinom ≥ 4 mm od zone inhibicije oko imipenema sa kloksacilinom izolat takođe pokazuje KPC aktivnost.
- Izmeri se zona oko imipenema sa dipikolinskom kiselinom i imipenema sa EDTA. Ako je zona oko imipenema sa dipikolinskom kiselinom ≥ 5 mm u poređenju sa zonom oko čistog imipenema i/ili je zona inhibicije oko imipenema sa EDTA ≥ 10 mm u odnosu na zonu inhibicije oko čistog imipenema soj proizvodi metalo beta laktamaze.
- **Testiraju se samo ceftazidim rezistentni izolati.** Lažno pozitivni rezultati mogu biti kod ceftazidim osetljivih izolata.
- Proveri se da li ima sinergističkog delovanja između imipenema i imipenema sa dipikolinskom kiselinom (u slučaju da nema zone inhibicije oko imipenema 10 µg).
- Poređenje zona inhibicije oko imipenema sa kloksacilinom i zona inhibicije oko imipenema 10 µg može da koristi za skrining karbapenemaza produkujućih sojeva *P.aeruginosa*. Ako je zona oko kombinovanog diska ≥ 5 mm u odnosu na zonu oko čistog imipenema soj **ne proizvodi** karbapenemaze.
- Za *Acinetobacter* i oksacilinaze:

Oksacilinaze su pod uticajem EDTA i daju slab sinergizam između imipenema i EDTA, dok dipikolinska kiselina nema nikakav efekat. Ovo se može koristiti da se otkriju oksacilinaze kod *Acinetobacter* vrsta (pogledati u tabeli 4).

U tabeli 3. i 4. su ukratko prikazani mogući ishodi ovog testa.

Tabela 3. Interpretacija rezultata fenotipskog ispitivanja prisustva karbapenemaza kod *P.aeruginosa* i *Acinetobacter* spp.

	MacConkey agar		Imipenem sa fenilbornom kiselinom	Imipenem sa kloksacilinom	Imipenem sa dipikolinskom kiselinom	Imipenem sa EDTA
Ne proizvode karbapenemaze	<i>P.aeruginosa</i>	Imipenem 10 µg	/	≥5 mm		
KPC	<i>P.aeruginosa</i>	Imipenem 10 µg	≥4 mm i	<3 mm		
		Imipenem sa kloksacilinom	≥4 mm			
MBL	<i>P.aeruginosa</i>	Imipenem 10 µg	-	-	≥5 mm ili sinergizam	≥10 mm
	<i>Acinetobacter</i>		-	-	≥5 mm ili sinergizam	≥10 mm

Tabela 4. Interpretacija rezultata fenotipskog ispitivanja prisustva oksacilinaza kod *Acinetobacter* spp.

<i>Acinetobacter</i> i oksacilinaze			Imipenem sa dipikolinskom kiselinom	Imipenem sa EDTA
Oksacilinaze	<i>Acinetobacter</i>	Imipenem 10 µg	≤3 mm	4-7 mm

Soj ne pokazuje ni AmpC, KPC ni MBL aktivnost: sve zone su 2 mm jedne od drugih.

Do sada ima malo ili nimalo iskustva u otkrivanju KPC kod *Acinetobacter* vrsta, stoga se ne može sa sigurnošću reći da li će ova metoda uspeti da ih otkrije ili ne.

4.6.3.3. AmpC potvrdni test

a) Princip metode

Rosco Diagnostica potvrdni fenotipski test za otkrivanje AmpC (Rosco Diagnostica, Danska) sastoji se od 4 tablete: tableta A sadrži cefotaksim 30 µg, tableta B sadrži cefotaksim sa kloksacilinom, tableta C sadrži ceftazidim 30 µg, tableta D sadrži ceftazidim sa kloksacilinom. Kloksacilin je AmpC inhibitor. Soj za koji se sumnja da ima AmpC aktivnost pokazuje razliku u zonama inhibicije oko cefalosporina samih i onih u kombinaciji sa inhibitorom.

b) Procedura izvođenja

- Od sveže i čiste prekončne kulture nekoliko kolonija se resuspenduje u 0,9% NaCl radi dobijanja zamućenja inokuluma koje je jednako zamućenju 0,5 standarda McFarland skale, što odgovara ukupnom broju bakterija od približno $1-2 \times 10^8$ /ml. U ispitivanjima je korišćen gotov (kupljen) McFarland 0,5 standard (Becton Dickinson).
- Inokuliše se sterilnim brisom na ploču Miler Hinton agara.
- Postave se tablete tako da ima dovoljno prostora među diskovima da može da se očita zona inhibicije.
- Inkubira se na $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 18-24^h.
- Mere se i beleže prečnici zone inhibicije. Ako nema zone oko diska to odgovara veličini zone inhibicije od 9 mm.

c) Očitavanje rezultata

Rezultati se tumače poređenjem zona inhibicije oko različitih tableta.

- Porede se zone inhibicije oko cefotaksima 30 µg i ceftazidima 30 µg sa zonama inhibicije oko cefotaksima sa kloksacilinom i ceftazidima sa kloksacilinom. Ako su zone inhibicije oko tableta do 3 mm jedne od drugih, smatra se da soj nema AmpC aktivnost.
- Izmeri se zona inhibicije oko cefotaksima sa kloksacilinom i ceftazidima sa kloksacilinom i uporediti ih sa zonama oko cefotaksima 30 µg i ceftazidima 30 µg. Ako jedan ili oba kombinovana diska pokazuju zonu ≥ 5 mm od pojedinačnog diska soj ima AmpC aktivnost.

U tabeli 5. su ukratko prikazani mogući ishodi ovog testa.

Tabela 5. Interpretacija rezultata fenotipskog ispitivanja prisustva cefalosporinaza

		Cefotaksim 30 µg	Ceftazidima 30 µg
AmpC	Cefotaksim sa kloksacilinom	≥5 mm	-
AmpC	Ceftazidim sa kloksacilinom	-	≥5 mm

Nema AmpC aktivnosti: ako su sve zone kombinovanih diskova do 2mm u odnosu na odgovarajuće pojedinačne tablete.

“ – “ znači da druge razlike nisu bitne (npr. Cefotaksim sa kloksacilinom ne treba upoređivati sa Ceftazidimom 30 µg u cilju utvrđivanja AmpC aktivnosti).

4.6.4. Ispitivanje beta laktamaza proširenog spektra delovanja, odnosno ESBL test

a) Princip metode

Beta laktamaze proširenog spektra delovanja se smatraju „skrivenim mehanizmom rezistencije“ i ne mogu se otkriti u rutinskom ispitivanju osetljivosti bakterija na antibiotike. Ne postoji standardizovan metod za otkrivanje ESBL pozitivnih sojeva. U upotrebi je nekoliko metoda, ali nijedna nije u potpunosti jasno koncipirana, naročito kod očitavanja rezultata, tako da uvek može doći do grešaka u proceni koji su sojevi bakterija ESBL pozitivni, a koji ne. Kao i do sada, u ovom istraživanju korišćene su preporuke CLSI iz 2015.godine.

b) Procedura izvođenja

Referentna podloga za ovu metodu je takođe Mueller Hinton agar (BioMerieux). Inokulum je pripreman kao i za disk difuzionu metodu, a zasejavanje inokuluma takođe. Svaki soj obuhvaćen ovim ispitivanjem najpre je prošao takozvani *screening test*: na inokulisane MH ploče su bili postavljani i cefalosporini treće generacije navedeni u tabeli 6 i aztreonam. Razmak između diskova morao je iznositi 3 do 5 cm. Na osnovu rezultata tj. veličine zona inhibicije rasta procenjivalo se da li je soj sumnjiv na prisustvo ESBL ili je soj odbacivan kao ESBL negativan. Ukoliko su očitane zone bile manje od navedenih u donjoj tabeli, podrazumevalo se da je soj eventualno pozitivan odnosno sumnjiv na ESBL i neophodno je bilo uraditi i potvrdni ESBL test. Antibiotici

u tabeli 6 su navedeni po značaju za otkrivanje ESBL pozitivnih sojeva. Upotrebljeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson.

Tabela 6. Granične vrednosti zona inhibicije rasta bakterija kod skrining ESBL testa za postavljanje sumnje na prisustvo enzima ESBL

Antibiotik	Koncentracija antibiotika	Zona inhibicije u mm za postavljanje sumnje
Cefpodoksim	10 μ g	≤ 17
Ceftazidim	30 μ g	≤ 22
Cefotaksim	30 μ g	≤ 27
Ceftriakson	30 μ g	≤ 25
Aztreonam	30 μ g	≤ 27

Ako je screening test bio negativan, soj je smatran sigurno ESBL negativnim. Ukoliko je bio pozitivan, obavezno je rađen i povrdni test. Neophodno je bilo u skrining testu postaviti sve nabrojane antibiotike iz tabele 6 s obzirom da se nekada sumnja postavljala na osnovu veličine zone inhibicije rasta samo oko jednog od ovih antibiotika.

- *Potvrđni test:* Inokulum je bio pripremljen po opisanoj proceduri za pripremanje inokuluma kod izvođenja disk difuzione metode. U ispitivanju je bio upotrebljen Mueller Hinton agar i diskovi sledećih antibiotika, svi od proizvođača Becton Dickinson:

- Ceftazidim, 30 μ g
- Ceftazidim + klavulanska kiselina, 30/10 μ g
- Cefotaksim, 30 μ g
- Cefotaksim + klavulanska kiselina 30/10 μ g

Inkubacija je trajala 18 h do 24 h na temperaturi od 37°C. Ukoliko su zone inhibicije porasta oko ceftazidima sa klavulanskom kiselinom i (ili) cefotaksima sa klavulanskom kiselinom bile ≥ 5 mm veće od zona inhibicije porasta oko cefotaksima i/ili ceftazidima bez klavulanske kiseline, soj se smatra ESBL pozitivnim. Ukoliko su

zone inhibicije oko svih antibiotika bile iste ili različite ali do 4 mm razlike, soj je sigurno ESBL negativan.

c) Kontrola kvaliteta

Kontrola kvaliteta ESBL testa je moguća bez obzira na to što test nije standardizovan, a vrši se pomoću referentnog soja *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Ovaj soj je ESBL pozitivan i daje tipične, pozitivne rezultate za ovaj oblik rezistencije. Međutim, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 je veoma teško dostupna za nabavku prvenstveno jer je soj veoma skup. Osim toga, procedura uvozne nabavke je isuviše komplikovana s obzirom da soj nosi gene rezistencije za enzime iz ESBL grupe. Zato, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 pripada opasnim biološkim agensima najviše zbog mogućnosti lakog i nekontrolisanog širenja ESBL gena. U ovom istraživanju nije vršena kontrola kvaliteta izvedenog ESBL testa.

4.7. Ispitivanje prisustva plazmida kod sojeva poreklom od riba

4.7.1. Sojevi bakterija koji su ispitivani

Ispitivanjem su bili obuhvaćeni sojevi *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* vrsta poreklom od riba. Ispitivani sojevi zasejavani su u LB bujon sa odgovarajućim antibiotikom i inkubisani na temperaturi od 27°C 12-16 h.

4.7.2. Metoda za izolaciju plazmida, princip i procedura izvođenja

Poznato je da *Pseudomonas* vrste najčešće poseduju džinovske, takozvane megaplazmide. Stoga, korišćena je metoda po Weatcroft-u i Williams-u. Metoda zahteva primenu sledećih reagenasa:

Sastav reagensa A:

- | | |
|--------------------------|----------|
| a) TRIS (Serva) | 50 mM |
| b) EDTA (Serva) | 50 mM |
| c) Xylene Cyanol (Serva) | 10 mg/ml |

Sastav reagensa B

- a) NaOH 1N
b) Natrijum dodecil sulfat (SDS) 10 %

Reagens B se sastoji od 90 ml komponente **a** i 10 ml komponentne **b**, i to je 1% SDS u 1N NaOH.

Sastav reagensa C

Fenol:hloroform:izoamilalkohol (49,5:49,5:1) (Fluka)

Princip metode je sličan principu drugih metoda za izolaciju plazmida (alkalna liza ćelije) međutim, ekstrakcija plazmidne DNK i denaturacija hromozomalne DNK vrše se pomoću smeše fenol:hloroform:izoamilalkohol.

Nakon kultivisanja sojeva u LB bujonu, ćelije su centrifugirane 2 minuta na 13000 rpm. Ćelijski pelet (talog) resuspendovan je u 100 µl reagensa A, na koji je odmah dodato i 25 µl reagensa B nakon čega je uzorak izmešan na vorteksu 1 minut. Potom je dodato 250 µl reagensa C i uzorak je ponovo izmešan na vorteksu 2 minuta. Nakon toga uzorci su odmah centrifugirani na 13000 rpm u trajanju od 2 minuta. Nakon centrifugiranja u uzorcima su se odvajale 3 faze: gornja, vodena faza u kojoj je plazmid, srednja faza-precipitat hromozomalne DNK i donja koju čini fenol sa ćelijskim detritusom. Gornja vodena faza je bila pažljivo odpipetirana u novu ependorf-kivetu i odmah joj je dodavana 6 x koncentrovana boja za nanošenje uzoraka na gel (6 x loading dye solution, Thermo Fisher Scientific, USA) i to u odnosu 5 µl uzorka i 1 µl boje. Uzorci u količini od 25 µl nanošeni su na 0,65% agarozni gel pripremljen u TBE puferu bez etidijum bromida. Elektroforeza se odvijala u TBE puferu pri naponu struje od 70 V, 33,5 mA, 2W tokom 2 sata. Bojenje fragmenata dobijenih iz DNK plazmida vršeno je potapanjem agaroznog gela nakon završene elektroforeze u rastvor etidijum bromida koncentracije 5 µg/ml koji je pripreman tako što je 100 µl etidijum bromida koncentracije 10 mg/ml rastvarano u 100 ml dejonizovane vode. Bojenje je trajalo 10 minuta, a rezultati su očitavani na transiluminatoru.

4.7.3. Određivanje veličine dobijenih plazmida

Restrikciona digestija džinovskih plazmida kao što su plazmidi izolovani iz *Pseudomonas* vrsta najčešće nije moguća zbog takozvanih steričnih smetnji (restrikcioni

enzim zbog specifične konfiguracije ogromnog molekula DNK ne može da prepozna tj. pronađe palindromsku sekvencu). Stoga je veličina plazmida iz uzoraka koji su ispitivani određivana pomoću matematičkog izračunavanja, a na osnovu relativne pokretljivosti markera za plazmide. U tu svrhu bio je upotrebljen marker plazmid veličine 255 kb izolovan iz soja *Agrobacterium rhizogenes* A4M70 GUS. Navedeni soj je primenom genetičkog inženjeringa specifično dizajniran tako da, ako se kultiviše na optimalnoj temperaturi uvek proizvodi plazmid navedene veličine. Soj *Agrobacterium rhizogenes* A4M70 GUS je dobijen ljubaznošću kolega sa odseka za fiziologiju i patologiju biljaka u okviru Instituta za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd. Soj je mogao biti kultivisan isključivo na Y.E.B. bujonu i Y.E.B. agaru (Yeast extract beef; podloga sa ekstraktom kvasca i ekstraktom goveđeg mesa).

Podloga je pripremana po sledećoj preskripciji:

a) Ekstrakt goveđeg mesa (Difco)	5g
b) Ekstrakt kvasca (Difco)	1g
c) Pepton -kazein hidrolizat (Torlak)	5g
d) Sukroza (Analar)	5g
e) MgSO ₄ (Merck)	2 mM
f) Agar (BioLab)(za Y.E.B. agar)	15 g
g) Destilovana voda	1000 ml

Soj *Agrobacterium rhizogenes* rastao je na optimalnoj temperaturi od 27°C tokom 3 do 5 dana. Za izolaciju plazmida iz ovog soja upotrebljena je ista metoda kao i za izolaciju plazmida iz *Pseudomonas* vrsta. Nakon elektroforeze na agaroznom gelu meren je pređeni put marker plazmida na gelu agaroze izražen u milimetrima i pređeni put plazmida koji su ispitivani, takođe izražen u milimetrima, a izračunavanje približne veličine plazmida vršeno je prema formuli:

$$\log \frac{M_{tx}}{M_{tm}} = \frac{R_{Mm}}{R_{Mx}}$$

M_{tx} = Molekulska masa nepoznatog plazmida

M_{tm} = Molekulska masa marker plazmida

R_{Mm} = Relativna mobilnost marker plazmida

R_{Mx} = relativna mobilnost nepoznatog plazmida

Iz gornje formule proizilazi da je:

$$M_{tx} \times R_{Mx} = M_{tm} \times R_{Mm}$$

4.8. Transformacija kompetentnih ćelija plazmidima izolovanim iz sojeva roda *Pseudomonas*

Za ovu vrstu ispitivanja upotrebljen je TransformAid Bacterial Transformation Kit (Fermentas). Korišćene su kompetentne ćelije *E.coli* DH5 α (dobijen ljubaznošću kolega sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd).

Osnovna karakteristika svih komercijalno dostupnih kompetentnih sojeva *E.coli* je da imaju svoju fenotipsku i genotipsku oznaku. Soj koji je korišćen u ovom istraživanju imao je sledeće karakteristike:

E.coli DH5 α

F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG 80d lacZ Δ M15

Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), ϵ -

Tumačenje ovih oznaka može biti komplikovano čak i za molekularne biologe, i zato je potrebno koristiti specijalizovanu literaturu. Oznake su bitne sa stanovišta toga šta se želi raditi sa kompetentnim ćelijama. Na primer:

- *endA* je oznaka da soj ne sadrži endonukleaze i da neće degradirati egzogenu DNK nakon transformacije.
- *gln V44* je oznaka da soj ima mutaciju na genu za aminokiselinu glutamin, tj. ne proizvodi je i ne može da raste na medijumu koji ne sadrži glutamin (nekada za ovu osobinu postoji oznaka *glu2*)
- *thi-1* je oznaka za mutaciju na genu za proizvodnju B1 vitamina (tiamina) i da soj ne može da raste na medijumu kome nije dodat vitamin B1.
- *recA* je oznaka da soj ne vrši rekombinaciju homologne DNK. Rekombinacija homologne DNK može da dovede do delecije i rearanžiranja u strukturi plazmida zbog čega je u ovom istraživanju bilo neophodno da kompetentne ćelije imaju upravo ovu oznaku.
- *hsdR* je oznaka da soj ne vrši restrikciju metilovane DNK.
- F⁺ ili F' su oznake za prisustvo F plazmida kod kompetentnih ćelija. Ovaj F plazmid je ogroman, veličine 99 kb i proizvodi ga *E.coli* soj K12, kao i svi sojevi koji potiču od K12. Ima značaja za prijemčivost kompetentnih ćelija za infekciju nekim bakteriofagima. Međutim, značajan je i za ovo istraživanje jer se

nakon transformacije sa divljim plazmidima iz kompetentnih ćelija koje su transformisane obavezno mora reizolovati isti plazmid u svrhu dokazivanja uspešnosti transformacije. Prisustvo F plazmida može stoga veoma da oteža ovu fazu rada jer njegovo prisustvo može da maskira prisustvo traženog plazmida. U ovom istraživanju korišćen je soj *E.coli* DH5 α koji je F- (nema F plazmid).

Ostale oznake nisu značajne za ovo istraživanje.

Za proveru uspešnosti transformacije i prisustva gena rezistencije kod ćelija transformanata upotrebljen je UTI agar sa različitim antibioticima i to: piperacilinom 16 $\mu\text{g/ml}$; imipenemom 8 $\mu\text{g/ml}$; gentamicinom 256 $\mu\text{g/ml}$; ciprofloksacinom 32 $\mu\text{g/ml}$ i ceftazidimom 32 $\mu\text{g/ml}$. Za ovu svrhu korišćene su čiste aktivne supstancije antibiotika proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Takođe, UTI agar sa navedenim antibioticima korišćen je i za proveru kvaliteta netransformisanih kompetentnih ćelija koje ne rastu na podlogama sa antibiotikom, čak iako je koncentracija antibiotika minimalna, na primer $<10 \mu\text{g/ml}$.

Priloženi rastvori uz TransformAid Bacterial Transformation Kit bili su C-Medium za kultivaciju kompetentnih ćelija, T-rastvor A i T-rastvor B. TransformAid Bacterial Transformation Kit čuvan je na temperaturi od minus 20°C.

4.8.1. Procedura izvođenja transformacije

Nakon zasejavanja kompetentnih ćelija na UTI agar bez antibiotika i kultivacije na temperaturi od 37°C tokom 16 do 18 h, jedna kolonija presejana je u 1,5 ml C-Medijuma koji je potom bio inkubisan 2 h na temperaturi od 37°C. Pomešane su jednake količine T-rastvora A i T-rastvora B (po 500 μl), a novonastala mešavina označena je kao T-rastvor. Nakon završene inkubacije C-Medijum je centrifugiran 1 minut, pri brzini od 14.000 o/m i na temperaturi od 4°C. Supernatant je odbačen, a istaložene ćelije su resuspendovane u 300 μl T-rastvora i ostavljene na led tokom 5 minuta. Centrifugiranje je ponovljeno, supernatant je odbačen, a istaložene ćelije su bile resuspendovane u 120 μl T-rastvora i ponovo bile ostavljene na led tokom 5 minuta.

Priprema DNK (plazmida) za transformaciju vršena je odmeravanjem u čiste ependorf-kivete 1 μl plazmida koji je ispitivan i držanjem na ledu 2 minuta. Potom je 50 μl resuspendovanih kompetentnih ćelija u T-rastvoru iz prethodne faze rada bilo dodato u kivetu sa DNK koja je ispitivana i cela smeša je ostavljena na led tokom 5 minuta.

Nakon toga vršeno je zasejavanje transformisanih kompetentnih ćelija na UTI podlogu sa antibiotikom.

4.8.2. Očitavanje rezultata

Porast ćelija transformanata na UTI agaru sa određenim antibiotikom značio bi da je DNK (plazmid) koji je ubačen u ćeliju transformanta nosioc gena rezistencije na taj antibiotik. Istovremeno, netransformisana kompetentna ćelija ne sme da poraste na UTI agaru sa datim antibiotikom.

4.9. Konjugacija

4.9.1. Procedura izvođenja konjugacije

U po 4 ml LB bujona sa određenim antibiotikom (piperacilinom 16 µg/ml; imipenemom 8 µg/ml; gentamicinom 256 µg/ml; ciprofloksacinom 32 µg/ml ili ceftazidimom 32 µg/ml) zasejavani su sojevi *Pseudomonasa* koji su korišćeni kao ćelije donori. U po 4 ml LB bujona bez antibiotika zasejavan je soj *E.coli* K12 (NCTC 10538) koji je korišćen kao ćelije recipijenti. Posle inkubacije od 18-24^h na 27^oC iz LB bujona sa donorskim ćelijama uziman je po 0,1 mL donorske suspenzije a iz LB bujona sa ćelijama recipijentima uzimano 0,9 ml suspenzije i prebacivano u novih 4 ml LB bujona bez antibiotika. Inkubirano je u termostatu na 27^oC pola sata. Zatim je po mililitar zasejavan na UTI agar sa odgovarajućim antibiotikom (piperacilinom 16 µg/ml; imipenemom 8 µg/ml; gentamicinom 256 µg/ml; ciprofloksacinom 32 µg/ml ili ceftazidimom 32 µg/ml) i inkubirano na 27^oC 18-24^h. Posmatran je porast konjugovanih ćelija *E.coli* NCTC 10538 na UTI agaru sa antibioticima.

4.10. Ispitivanje prisustva gena odgovornih za različite mehanizme rezistencije metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Izolacija genomske DNK ispitujućih sojeva rađena je po metodi referentne laboratorije EU kao što je opisano u poglavlju 4.3. Izolacija plazmidske DNK ispitujućih sojeva vršena je po metodi opisanoj u poglavlju 4.7.1.1. Sekvence, veličine i proizvođači svih korišćenih prajmera nalaze se u tabeli 7.

4.10.1. Ispitivanje prisustva gena za 16S rRNK metiltransferaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Utvrđivanje prisustva gena odgovornih za rezistenciju na aminoglikozide vršeno je multiplex PCR protokolom za detekciju *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *rmtE* gena opisanom od strane autora Doi i Arakawa 2007. godine.

PCR smeša u količini od 50 µl sastojala se od: 25 mM MgCl₂ ako je pufer bez magnezijuma, 1 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 0,4 mM, po 5 µM svakog prajmera, 1 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (Thermo Scientific) i 10 µl DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 5 minuta, 25 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, annealing 50°C tokom 30 sec, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 5 minuta. Korišćene su pozitivne DNK kontrole sa genima *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *rmtE* dobijene ljubaznošću kolega sa Veterinarskog Fakulteta u Madridu, Departmana za mikrobiologiju. Pozitivna DNK kontrola sa genom *armA* dobijena je ljubaznošću kolega iz Laboratorije za infektivne bolesti pri Departmanu za internu medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Atini, Grčka.

4.10.2. Ispitivanje prisustva gena za metalo beta laktamaze (VIM, IMP, SPM, GIM) i gena za beta laktamaze proširenog spektra delovanja (TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9) OXA-1 i OXA-9 beta-laktamaze, karbapenemaze (OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58) metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Utvrđivanje prisustva gena odgovornih za rezistenciju na metalo beta laktamske i beta laktamske antibiotike proširenog spektra delovanja vršeno je pojedinačnim PCR protokolima za detekciju CTX-M grupa 1 i 9, TEM, SHVA, VIM, IMP, SPM, GIM, OXA-9, OXA-1 grupa, OXA-23 grupa, OXA-24 grupa, OXA-40 grupa, OXA-58 grupa gena opisanom od strane autora Geyer i Hanson 2013. godine.

PCR smeša u količini od 50 µl sastojala se od: 4 ili 5 mmol/L MgCl₂, 1 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 200 µmol/L, po 2 µmol/L svakog prajmera, 1 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (5 U/µl) (Thermo Scientific) i 2 µl DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj

šemi: inicijalna denaturacija 95°C 5 minuta, 25 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, annealing 50°C tokom 30 sec, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 5 minuta. Kao pozitivne kontrole za TEM, SHV, OXA i CTX-M beta laktamaze pozitivne DNK kontrole su dobijene ljubaznošću kolega sa Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad” iz Novog Sada.

4.10.3. Ispitivanje prisustva gena za karbapenemaze (KPC, NDM) metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Utvrđivanje prisustva KPC gena odgovornih za rezistenciju na karbapeneme vršeno je pojedinačnim PCR protokolom opisanom od strane autora Shanmugam i saradnici, 2013. godine.

PCR smeša u količini od 50 µl sastojala se od: 25mM MgCl₂, 10 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 25 mM, po 5 µM svakog prajmera, 2,5 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (5 U/µl) (Thermo Scientific) i 2 µl DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 4 minuta, 30 ciklusa denaturacije na 95°C 1 minut, annealing 51°C tokom 30 sec, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 5 minuta.

Utvrđivanje prisustva NDM gena odgovornih za rezistenciju na karbapeneme vršeno je pojedinačnim PCR protokolom opisanom od strane autora Fallah i saradnici, 2014. godine.

PCR smeša u količini od 50 µl sastojala se od: 25mM MgCl₂, 10 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 25 mM, po 5 µM svakog prajmera, 2,5 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (5U/ µl) (Thermo Scientific) i 2 µl DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 4 minuta, 36 ciklusa denaturacije na 95°C 1 minut, annealing 52°C tokom 1 minuta, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 5 minuta.

Kao pozitivne kontrole upotrebljene su *Klebsiella pneumoniae* BAA 2146 (bla_{NDM}⁺/bla_{KPC}⁻), *Escherichia coli* BAA 2469 (bla_{NDM}⁺/bla_{KPC}⁻) i *Klebsiella pneumoniae* BAA 2344 (bla_{KPC}⁺/bla_{NDM}⁻) (Microbiologics, USA).

4.10.4. Ispitivanje prisustva gena za AmpC beta laktamaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Utvrđivanje prisustva grupnog AmpC gena odgovornog za rezistenciju na beta laktamske antibiotike vršeno je pojedinačnim PCR protokolom opisanom od strane autora Jamali i saradnici, 2015. godine.

PCR smeša u količini od 50 μ l sastojala se od: 2 mM MgCl₂, 10 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 0,2 mM, po 10 pmol svakog prajmera, 1,25 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (5 U/ μ l) (Thermo Scientific) i 2 μ l DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 10 minuta, 35 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, annealing 63°C tokom 30 sekundi, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 10 minuta.

Utvrđivanje prisustva pojedinačnih gena odgovornih za rezistenciju na beta laktame vršeno je multiplex PCR protokolom za detekciju MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM gena opisanom od strane autora Perez-Perez i saradnici 2002. godine.

PCR smeša u količini od 50 μ l sastojala se od: 1,5 mM MgCl₂, 1 x Hot Start PCR pufera (200 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM KCl; 50 mM (NH₄)₂SO₄; Thermo Scientific), svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) u koncentraciji od 0,2 mM, po 0,6 μ M prajmera MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF i DHAMR; 0,5 μ M prajmera ACCMF, ACCMR, EBCMF i EBCMR; 0,4 μ M prajmera FOXMF i FOXMR, 1,25 U Maxima Hot Start Taq Polimeraze (5U/ μ l) (Thermo Scientific) i 2 μ l DNK. Uslovi PCR reakcije odvijali su se po sledećoj šemi: inicijalna denaturacija 95°C 3 minuta, 25 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, annealing 64°C tokom 30 sekundi, ekstenzija 72°C 1 minut i finalna ekstenzija 72°C 7 minuta. Za sve nabrojane tipove AmpC beta laktamaza korišćene su pozitivne DNK kontrole dobijene ljubaznošću kolega sa Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tabela 7. Lista prajmera korišćenih za genotipizaciju i detekciju gena rezistencije sa nazivima, sekvencama, veličinom amplikona, referencama i nazivima proizvođača

	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina PCR produkta	Referenca	Proizvođač prajmera
<i>Pseudomonas</i>	Pseudo sp. F	5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA-3'	618	Spilker i saradnici 2004. godina	Metabion
	Pseudo sp. R	5'CACTGGTGTTCCTTCCTATA – 3'			
<i>Stenotrophomonas</i>	Steno F	5'-GCTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC-3'	278	Gallo i autori 2013. godina	Metabion
	Steno R	5'-ACGCAGTCACTCCTTGCG -3'			
16S rRNK metiltransferaze	armAF	5'-CAAATGGATAAGAATGATGTT-3'	774	Doi i Arakawa 2007. godina	Invitrogen
	armAR	5'-TTATTTCTGAAATCCACT-3'			
	rmtAF	5'-ATGAGCTTTGACGATGCCCTA-3'	756		
	rmtAR	5'-TCACTTATTCCTTTTATCATG-3'			
	rmtBF	5'-ATGAACATCAACGATGCCCT-3'	769		
	rmtBR	5'-CCTTCTGATTGGCTTATCCA-3'			
	rmtCF	5'-CGAAGAAGTAACAGCCAAAG-3'	711		
	rmtCR	5'-ATCCCAACATCTCTCCACT-3'			
	rmtDF	5'-CGGCACGCGATTGGGAAGC-3'	401		
	rmtDR	5'-CGGAAACGATGCGACGAT-3'			
	rmtEF	5'-ATGAATATTGATGAAATGGTTGC-3'	818		
rmtER	5'-TGATTGATTCCTCCGTTTTTG-3'				
Metalo beta laktamaze i laktamaze proširenog spektra delovanja	CTX-M1F3	5'-GACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGC-3'	499	Geyer i Hanson 2013. godina	Metabion
	CTX-MIR2	5'-AGCCGCCGACGCTAATACA-3'			
	CTX-M914F	5'-GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG-3'	474		
	CTX-M914R	5'-GTAAGCTGACGCAACGTCTG-3'			
	TEM-prime1F	5'-AGATCAGTTGGGTGCACGAG-3'	750		
	TEM-prime2R	5'-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3'			
	SHV-prime2F	5'-GGGAAACGGAAGTGAATGAG-3'	149		
	SHV-prime3R	5'-ATCGTCCACCATCCACTGCA-3'			
	VIM1F	5'-GGTGTGGTTCGCATATCGC-3'	504		
	VIM1R	5'-CCATTCAGCCAGATCGGCATC-3'			
	IMP1F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTC-3'	328		
	IMP1R	5'-CAACCAGTTTTGCTTTACC-3'			
	SPM-RTF1	5'-CCCATCCTGTTCCAGCGG-3'	197		
	SPM-RTR1	5'-GGCATCTCCAGATAACC-3'			
	GIM-RTF1	5'-GCCCCGTGAAGGAAAGCCG-3'	106		
GIM-RTR1	5'-CCTCTGTATGCCAGCACC-3'				

	OXA91 F	5'-CGTCGCTCACCATATCTCCC-3'	315		
	OXA91 R	5'-CCTCTCGTGCTTTAGACCCG-3'			
	OXA1F	5'-TGTGCAACGCAAATGGCAC-3'	579		
	OXA1B 14	5'-CGACCCCAAGTTTCTGTAAGTG- 3'			
	OXA23 -intF1	5'-CAGAATATGTGCCAGCCTC-3'	546		
	OXA23 -intR1	5'-GCATTTCTGACCGCATTTCC-3'			
	OXA24 -intF1	5'-CACCTATGGTAATGCTCTTGC-3'	501		
	OXA24 -intR1	5'-CAACCTACCTGTGGAGTAACAC-3'			
	OXA40 -intF1	5'-CACCTATGGTAATGCTCTTGC-3'	491		
	OXA40 -intR1	5'-GTGGAGTAACACCCATTCC-3'			
	OXA58 -intF1	5'-GTGGGATGGAAAGCCACG-3'	376		
	OXA58 -intR1	5'-CACTTGCGGGTCTACAGC-3'			
Karbapenemaze	KPCF	5'-GCTCAGGCGCAACTGTAAG-3'	150	Shanmug am i saradnici , 2013. godina	Metabion
	KPCR	5'-AGCACAGCGGCAGCAAGAAAAG-3'			
	NDMF	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3'	621	Fallah i saradnici , 2014. godina	
	NDMR	5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'			
AmpC beta laktamaze	AmpCF	5'-CCCCGCTTATAGAGCAACAA-3'	634	Jamali i saradnici , 2015. godina	Invitrogen
	AmpCR	5'-TCAATGGTCGACTTCACACC-3'			
	MOXM F	5'-GCT GCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	520	Perez- Perez i saradnici 2002. godina	
	MOXM R	5'-CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'			
	CITMF	5'-TGGCCAGAAGTACAGGCAA-3'	462		
	CITMR	5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'			
	DHAM F	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	405		
	DHAM R	5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'			
	ACCM F	5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'	346		
	ACCM R	5'-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'			
	EBCMF	5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'	302		
	EBCM R	5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'			
	FOXMF	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATG- 3'	190		
	FOX R	5'-CAAAGCGGTAACCGGATTGG-3'			

5. REZULTATI

5.1. Izolacija i identifikacija sojeva bakterija koji su ispitivani

Od svih uzoraka riba, izolovano je više od 250 sojeva Gram negativnih bakterija od kojih je za dalje ispitivanje izabrano 140 sojeva koji pripadaju vrstama značajnim u kliničkoj praksi ljudi i životinja i za koje su u dokumentima CLSI i EUCAST date precizne granične vrednosti zona inhibicija i vrednosti MIK, kao i interpretativne kategorije. Takođe, u tim dokumentima data je i lista antibiotika na koje su ove vrste intrinzično rezistentne, tako da je bilo moguće jasno protumačiti i interpretirati dobijene rezultate ispitivanja osetljivosti ovih sojeva na antibiotike. Ostali sojevi bili su odbačeni jer su pripadali vrstama za koje nije jasno da li imaju bilo kakvog značaja u širenju gena rezistencije među bakterijama i za koje u dokumentima CLSI i EUCAST još uvek nisu date vrednosti graničnih zona inhibicije ni interpretativne kategorije, kao ni spisak antibiotika na koje su te vrste intrinzično rezistente, stoga nije bilo moguće dobiti validne rezultate ispitivanja za ove vrste (*Flavobacterium*, *Brevundimonas*, *Plesiomonas*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter* i *Chromobacter*).

Ukupno 18 (10,7%) sojeva je identifikovano kao *Stenotrophomonas maltophilia*. Rodu *Aeromonas* pripadalo je 22 soja (13%), uključujući vrste: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. cavia* i *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. Rodu *Acinetobacter* pripadalo je 6 (3,6%) sojeva uključujući vrste *A. lwoffii* i *A. baumannii* complex. Ukupno 40 (23,7%) sojeva pripadalo je familiji *Enterobacteriaceae*. Od toga 25 (62,5%) sojeva pripadalo je rodu *Enterobacter* sa vrstama *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. asburiae* i *E. gergoviae*. Rodu *Citrobacter* pripadalo je 7 (17,5%) sojeva sa vrstama *C. youngae*, *C. freundii*, *C. braakii* i *C. koseri*. Po 2 (5%) soja pripadalo je vrstama *Hafnia alvei* i *Leclercia adecarboxylata*, a po jedan soj (2,5%) vrstama *Serratia fonticola*, *Erwinia rhapontici*, *Rahnella aquatilis* i *Raoutella amnigenus*. U dalja ispitivanja ušlo je još 6 sojeva bakterija koji nisu mogli biti precizno identifikovani. Tačnije, nijednom od primenjenih metoda identifikacije uključujući i PCR, sekvenciranje gena za 16S ribozomalne RNK kao i MALDI-TOF nije moglo biti razvrstano da li ovi sojevi pripadaju rodu *Pseudomonas* ili *Stenotrophomonas*. Kako je kod ovih sojeva nađena zabrinjavajuća rezistencija na veliki

broj antibiotika, a posedovali su i konjugabilne plazmide, oni su uključeni u rezultate istraživanja.

5.1.1. Rod *Pseudomonas*

Izolovane bakterije su u najvećem broju pripadale ovom rodu. Od 140 sojeva, 48 (28,4%) sojeva je pripadalo rodu *Pseudomonas* uključujući sledeće vrste: *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.veroni*, *P.geniculata*, *P.oleovorans*, *P.stuzeri*, *P.mandeli*, *P.libaneasis*, *P.hibiscicola* i *Pseudomonas* sp.. Svih 48 sojeva je bilo oksidaza pozitivno i svi su bili rezistentni na sulfametoksazol sa trimetoprimom sa dobijenim vrednostima MIK >32 µg/mL.

5.1.2. Rod *Stenotrophomonas*

Ukupno 18 (10,7%) sojeva je identifikovano kao *Stenotrophomonas maltophilia*. Svih 18 sojeva je bilo negativno u oksidaza testu i bilo je osetljivo na sulfametoksazol sa trimetoprimom sa dobijenim vrednostima MIK <1 µg/mL.

5.1.3. Rod *Aeromonas*

Rodu *Aeromonas* pripadalo je 22 (13%) soja, uključujući sledeće vrste: *A.hydrophila*, *A.sobria*, *A.cavia* i *A.salmonicida* spp.*salmonicida*.

5.1.4. Rod *Acinetobacter*

Rodu *Acinetobacter* pripadalo je 6 (3,6%) sojeva uključujući sledeće vrste: *A.lwoffii* i *A.baumannii* complex.

5.1.5. Familija *Enterobacteriaceae*

Ukupno 40 (23,7%) sojeva pripadalo je familiji *Enterobacteriaceae*. Od toga 25 (62,5%) sojeva pripadalo je rodu *Enterobacter* sa vrstama *E.amnigenus*, *E.cloacae*,

E.asburiae i *E. gergoviae*. Rodu *Citrobacter* pripadalo je 7 (17,5%) sojeva sa vrstama *C.youngae*, *C.freundii*, *C.braakii* i *C.koseri*. Po 2 (5%) soja pripadalo je vrstama *Hafnia alvei* i *Leclercia adecarboxylata*, a po jedan soj (2,5%) vrstama *Serratia fonticola*, *Erwinia rhapontici*, *Rahnella aquatilis* i *Raoutella amnigenus*.

5.1.6. Sporni sojevi

Svih 6 spornih sojeva je bilo oksidaza pozitivno sa zakasnelom (sporom) reakcijom oksidaze, u očitavanjima osetljivosti na sulfametoksazol sa trimetoprimom nakon 18 h sojevi su bili jasno osetljivi sa vrednostima MIK <1 µg/mL, a nakon ponovnog očitavanja po isteku 22-24h bili su jasno rezistentni sa vrednostima MIK >32 µg/mL. Ovaj deo ispitivanja ponovljen je nekoliko puta, uvek su dobijeni identični rezultati nejednake osetljivosti u samo 6 h razlike u dužini inkubacije. Identični rezultati dobijeni su u ponavljanjima spomenutih testova kao i u disk difuzionoj metodi u kojoj je zona oko diska sulfametoksazol sa trimetoprimom u očitavanjima nakon 18 h inkubacije iznosila >16 mm, a u ponovnom očitavanju nakon 2-6 h, zona je bila 0 milimetara. Nedovoljno jasni rezultati identifikacije dobijeni su i metodom standardnog PCR, VITEK-MS, MALDI TOF/TOF i 16S rRNK sekvencioniranjem gena o čemu će biti detaljnije objašnjeno u posebnom pod poglavlju.

Zbirni prikaz rezultata ovog dela istraživanja nalazi se u tabeli 8.

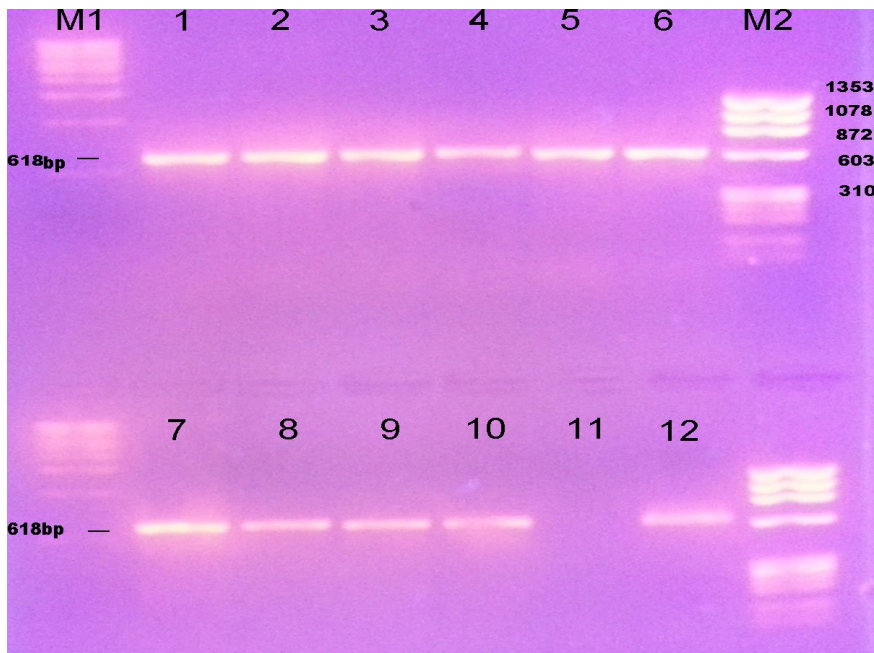
Tabela 8. Broj bakterija izolovanih i identifikovanih za potrebe ovog istraživanja

VRSTE BAKTERIJA					
Rod <i>Pseudomonas</i>	Rod <i>Stenotrophomonas</i>	Rod <i>Aeromonas</i>	Rod <i>Acinetobacter</i>	Familija <i>Enterobacteriaceae</i>	Sporni sojevi
48	18	22	6	40	6
UKUPNO 140					

Iz tabele 8 može se videti da je ispitivanjem bilo obuhvaćeno ukupno 140 sojeva bakterija.

5.2. Rezultati standardne lančane reakcije polimeraze (PCR), 16S rRNK sekvenciranja gena i metode masene spektrometrije MALDI – TOF

Na osnovu rezultata standardne lančane reakcije polimeraze (PCR), 16S rRNK sekvenciranja gena i metode masene spektrometrije MALDI-TOF, za 48 sojeva za koje se sumnjalo da pripadaju *Pseudomonas*, potvrđena je pripadnost tom rodu. U standardnom PCR testu, ti sojevi su dali pozitivan rezultat u vidu prisustva traženog PCR produkta veličine 618 bp (slika 1).

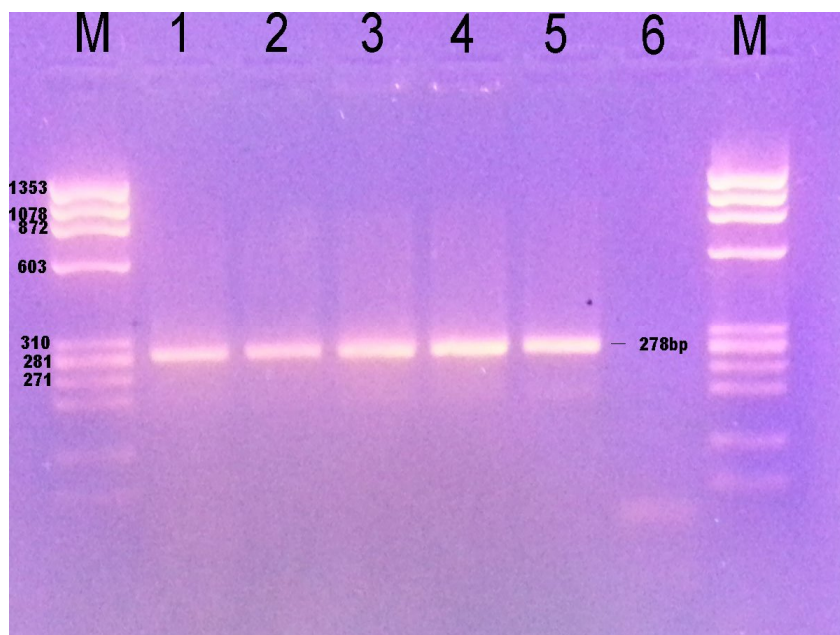


Slika 1. Elektroforeza u agaroznom gelu amplifikovanog fragmenta *Pseudomonas* spp. veličine 618-bp: M1- DNA Standard 1 KBp DNA ladder (SERVA); 1-5 pozitivni izolati *Pseudomonas* spp.; 6 pozitivna kontrola *P.aeruginosa* ATCC 27853; M2- Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (Fermentas); 7-10 pozitivni izolati *Pseudomonas* spp; 11 negativna kontrola *S. maltophilia* ATCC 13637; 12 pozitivna kontrola *P.aeruginosa* ATCC 27853

Od ta 48 soja, 3 je sa 99% tačnosti identifikovano kao *P.aeruginosa*, kako u analizama 16S rRNA sekvenciranja, tako i primenom aparata VITEK MS. Još dva soja su u 16S rRNA sekvenciranju bila identifikovana kao *P.fluorescens* sa 99% tačnosti, a VITEK MS je jedan od ta dva soja identifikovao kao *P.fluorescens* (99% tačnosti), dok drugi nije jasno identifikovan do vrste, ali je potvrđeno da pripada rodu *Pseudomonas*.

Ostala 43 soja su u 16S RNA sekvenciranju i primenom aparata VITEK MS sa 99% tačnosti identifikovani kao *Pseudomonas* spp.

U standardnom PCR testu, 18 sojeva koji su bili sumnjivi na pripadnost rodu *Stenotrophomonas* je dalo pozitivan PCR produkt veličine 278 bp koji je karakterističan za taj rod (slika 2).



Slika 2. Elektroforeza u agaroznom gelu amplifikovanog fragmenta *Stenotrophomonas* spp. veličine 278-bp: M-ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (Fermentas); 1-4 pozitivni izolati *Stenotrophomonas* spp.; 5 pozitivna kontrola *S. maltophilia* ATCC 13637; 6 negativna kontrola *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ti sojevi nisu analizirani u 16S RNA sekvenciranju. Identifikacija na aparatu VITEK MS je sa 99,9% tačnosti potvrdila da tih 18 sojeva pripada vrsti *Stenotrophomonas maltophilia* (tabela 9).

Tabela 9. Uporedni prikaz rezultata identifikacije izolovanih sojeva primenom metode standardnog PCR i MALDI-TOF metode

Izolati	Standardni PCR <i>Pseudomonas spp.</i>	Standardni PCR <i>Stenotrophomonas</i> <i>spp.</i>	VITEK MS
<i>Pseudomonas spp.</i> 48 izolata	48/48	0/48	48/48
<i>Stenotrophomonas</i> <i>spp.</i> 18 izolata	0/18	18/18	18/18

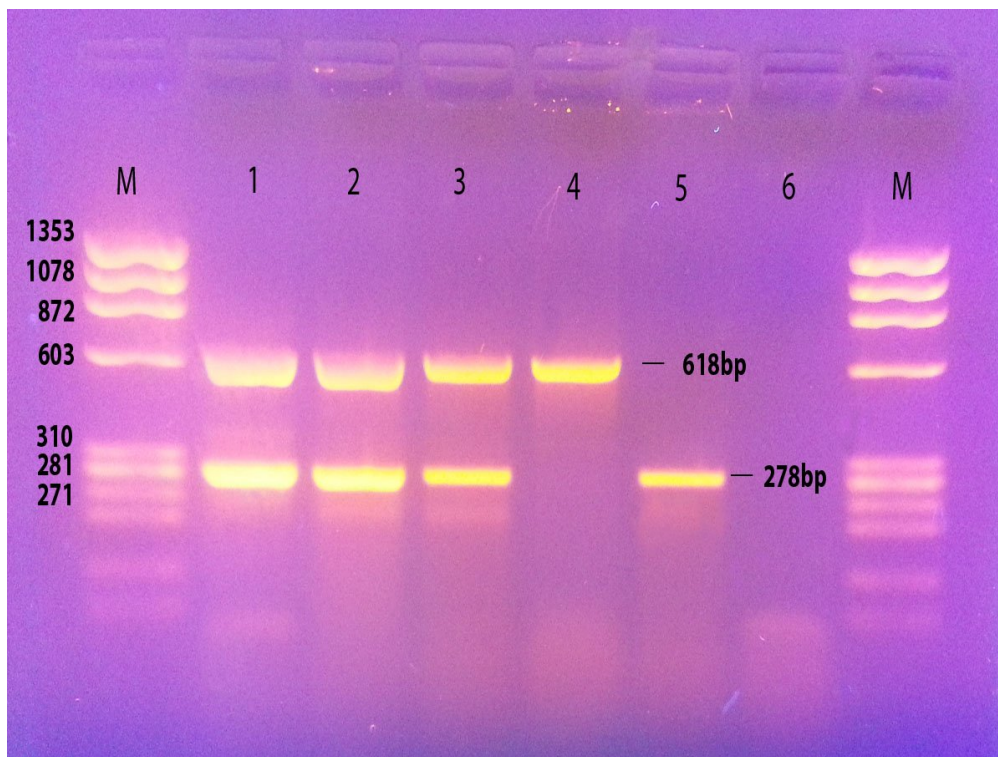
Daljom identifikacijom na aparatu VITEK MS je sa 99,9% tačnosti utvrđeno da od preostala 74 soja, 22 soja pripada rodu *Aeromonas*, 6 sojeva rodu *Acinetobacter* a 40 sojeva različitim vrstama familije *Enterobacteriaceae*.

Za poslednjih 6 sojeva nije bilo moguće postaviti sumnju o njihovoj vrsti/pripadnosti rodu i rađena je identifikacija i pomoću 16S rRNK sekvenciranja gena (1300 bp) (Tabela 10).

Tabela 10: Rezultati standardnog PCR, 16S rRNA sekvenciranja gena i MALDI TOF metode za 6 sojeva koji nisu jasno identifikovani primenjenim metodama

Izolat	Methodology			16s RNA identifikacija-Najbolje poklapanje sa GenBank				
	Standard ni PCR <i>Pseudomonas</i>	Standardni PCR <i>Stenotrophomonas</i> <i>spp.</i>	VITEK MS	MALDI TOF/TOF 4800Plus	Klasifikacija	Accession number	nt	%Identitet
1	-	-	<i>P.fluorescens</i> 34.2% <i>P.veroni</i> 34% <i>P.oleovorans</i> 31.7% <i>S.maltophilia</i> 99.9%	<i>S.maltophilia</i>	<i>P.hibiscicola</i> strain AT 106 <i>S.maltophilia</i> strain ISMMS2 <i>P.geniculata</i> strain IR66	KT387346	1352	99%
2	-	-	<i>P.fluorescens</i> 99.9%	<i>S.maltophilia</i>	<i>P.hibiscicola</i> strain AT 106 <i>S.maltophilia</i> strain ISMMS2	KT387346	1344	99%
3	-	-	<i>P.fluorescens</i> 99.9% <i>S.maltophilia</i> 99.9%	<i>S.maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i> strain RAT3A	KT248840	1351	99%
4	+	+	<i>P.fluorescens</i> 99.9% <i>S.maltophilia</i> 99.9%	<i>S.maltophilia</i>	<i>P.geniculata</i> strain R6-798 <i>S.maltophilia</i> strain ISMMS2	JQ659864	1347	99%
5	+	+	<i>P.fluorescens</i> 99.9% <i>S.maltophilia</i> 99.9%	ND	<i>P.geniculata</i> strain IR81 <i>S.maltophilia</i> strain ISMMS2	KJ396858	1341	100%
6	+	+	<i>P.fluorescens</i> 99.9%	ND	<i>P.geniculata</i> strain IR81 <i>S.maltophilia</i> strain ISMMS2	KJ396858	1346	99%

Za te sojeve PCR reakcija je ponovljena 3 puta i svaki put su ista tri soja bila dvostruko pozitivna, tj. PCR produkti su sadržavali i fragment za *Pseudomonas* od 618 bp i fragment za *Stenotrophomonas* od 278 bp. Pozitivna i negativna kontrola su u svim ponavljanjima bile validne (slika 3).



Slika 3. Elektroforeza u agaroznom gelu sa PCR produktima dobijenim u multipleks PCR za *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* (za 3 neidentifikovana soja): M-ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (Fermentas); 1-3 sojevi pozitivni za oba roda sa PCR produktima veličine 618 i 278 bp; 4 *P.aeruginosa* ATCC 27853; 5 *S. maltophilia* ATCC 13637; 6 negativna kontrola PCR.

U 16S rRNA sekvenciranju svaki od ova tri soja je identifikovan kao 99% *Pseudomonas* sp. i 99% *Stenotrophomonas* sp., odnosno, ti sojevi su kao i u metodi PCR sa 99% tačnosti kategorisani kao pripadnici oba roda. VITEK MS je ova tri soja u prvoj identifikaciji identifikovao kao 99% *Stenotrophomonas*, a u ponovljenoj identifikaciji ih je identifikovao kao 99% *Pseudomonas*. Ti sojevi su na aparatu MALDI TOF/TOF 4800 Plus bili identifikovani kao *Stenotrophomonas*.

Preostala tri soja u standardnom PCR su bila negativna, odnosno nisu pripadala rodovima *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas*. Za te sojeve PCR metoda je takođe ponovljena 3 puta i svaki put su sva tri soja bila negativna na tražene PCR produkte.

Međutim, u 16S rRNA sekvenciranju svaki od ova tri soja je identifikovan kao 99% *Pseudomonas* sp. i 99% *Stenotrophomonas* sp., odnosno, na osnovu 16S rRNA sekvenciranja ti sojevi su istovremeno identifikovani kao pripadnici oba roda. Aparat VITEK MS je ova tri soja identifikovao u jednoj identifikaciji kao 99% *Stenotrophomonas*, a u drugoj identifikaciji 99% kao *Pseudomonas*. Ti sojevi su na aparatu MALDI TOF/TOF 4800 Plus bili identifikovani kao *Stenotrophomonas maltophilia*.

5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike primenom disk difuzione metode

5.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda *Pseudomonas* izolovanih od riba primenom disk difuzione metode

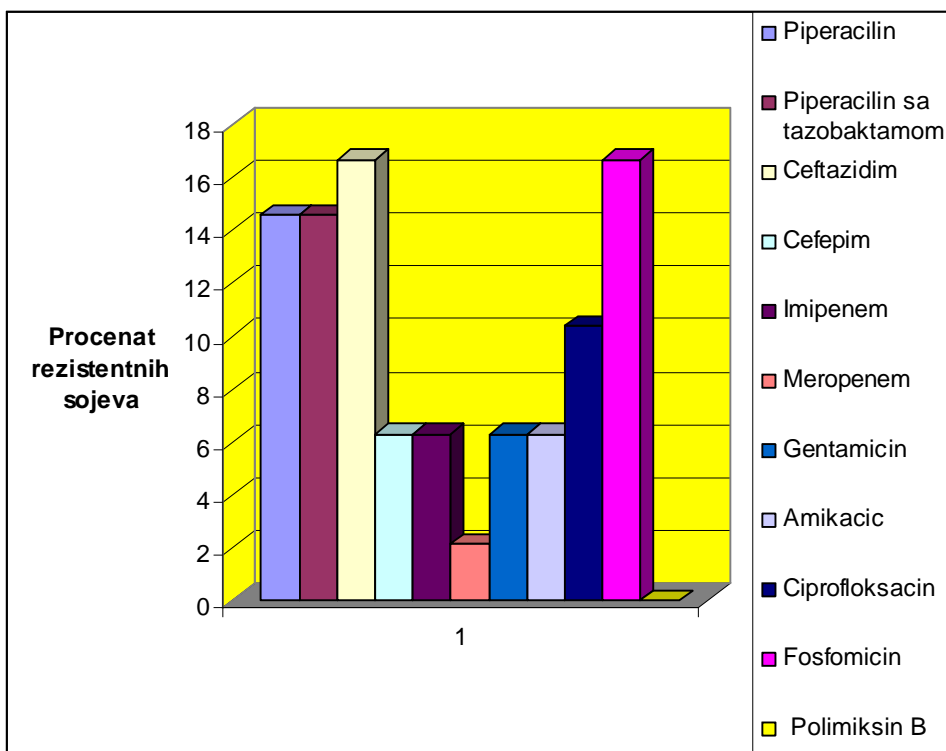
Kao što je već rečeno, ukupno je ispitano 48 sojeva *Pseudomonas* vrsta izolovanih od riba. Od tog broja 11 (22,9%) sojeva je bilo osetljivo na sve ispitivane antipseudomonasne antibiotike. Ostali sojevi bili su rezistentni na najmanje 1 a najviše na 9 antibiotika. Procentualna zastupljenost sojeva rezistentnih na 1, 2 ili više antibiotika prikazana je u tabeli 11. Multirezistentnih sojeva *Pseudomonas* vrsta (rezistentnih na 3 ili više antibiotika) bilo je ukupno 39.6 %. Tri soja (6,25%) rezistentna na 9 antibiotika identifikovana su kao *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 11. Rezultati zastupljenosti rezistentnih sojeva roda *Pseudomonas* dobijeni na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom

	Rezistencija na:								
	1 AB	2 AB	3 AB	4 AB	5 AB	6 AB	7 AB	8 AB	9AB
% sojeva	20,8	16,7	20,8	4,2	6,25	0	0	2,1	6,25

Najveće prisustvo rezistencije od 16.7 % otkriveno je na ceftazidim i fosfomicin – antibiotike koji se isključivo koriste u humanoj medicinskoj praksi, a najmanja

rezistencija od 2,1% utvđena je na meropenem. Nije nađena rezistencija kod ispitivanih sojeva iz roda *Pseudomonas* na polimiksin B što je sa stanovišta veterinarske medicine značajan nalaz. Ali je zato kod sojeva iz roda *Pseudomonas* izolovanih od riba nađena rezistencija na karbapeneme koji se uopšte i ne upotrebljavaju u veterinarskoj medicini već isključivo služe za lečenje ljudi od najtežih bakterijskih infekcija. Relativno zabrinjavajuća rezistencija na aminoglikozide i fluorohinolone nađena je kod 6,25% i 16,7% sojeva iz roda *Pseudomonas*. Ostali rezultati prikazani su u grafikonu 1.



Grafikon 1. Rezultati prisustva rezistencije na pojedine antibiotike kod sojeva roda *Pseudomonas* na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom (izraženo u procentima)

5.3.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda *Stenotrophomonas* izolovanih od riba primenom disk difuzione metode

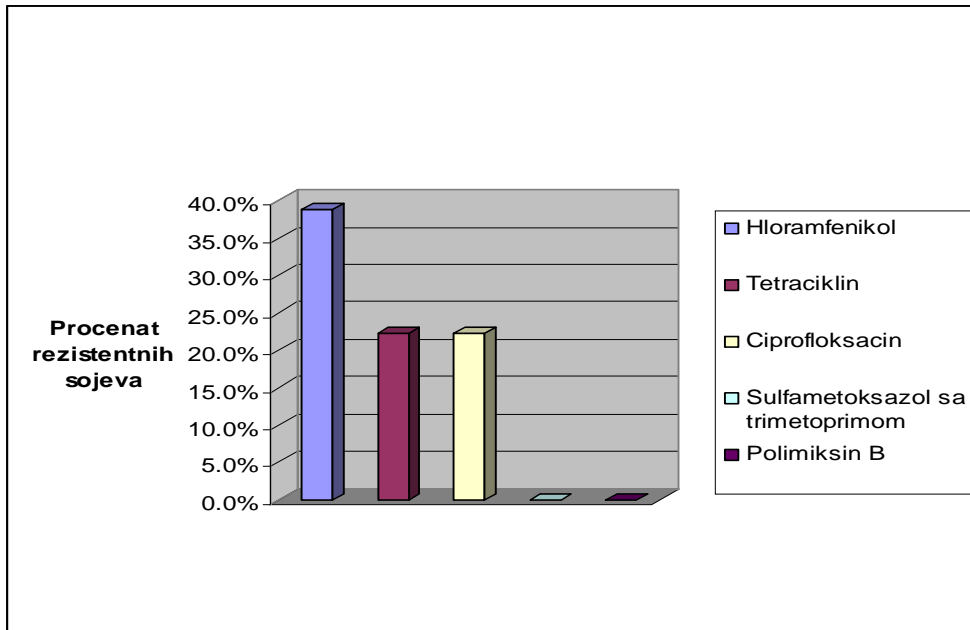
U ispitivanjima osetljivosti na antibiotike 18 sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* najvažniji je bio nalaz osetljivosti svih ispitivanih sojeva (100%) na

sulfametoksazol sa trimetoprimom, jer je ovo lek prvog i jedinog izbora u lečenju infekcija ljudi i životinja izazvanih ovom vrstom bakterije. Osetljivost na sve antibiotike pokazala su tri soja (16,7%). Ostali sojevi bili su rezistentni na najmanje 1 a najviše na 3 antibiotika. Procentualna zastupljenost sojeva rezistentnih na 1, 2 ili više antibiotika prikazana je u tabeli 12. Multirezistentnih sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* (rezistentnih na 3 ili više antibiotika) bilo je ukupno 22.2 %.

Tabela 12. Rezultati zastupljenosti rezistentnih sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* dobijeni na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom

	Rezistencija na:				
	1 AB	2 AB	3 AB	4 AB	5 AB
% sojeva	38,9	22,2	22,2	0	0

Najveća zastupljenost rezistencije otkrivena je na hloramfenikol 38,9 %, a najmanja od po 22,2% na ciprofloksacin i tetraciklin. Ni jedan od ispitivanih sojeva nije bio rezistentan na polimiksin B i sulfametoksazol sa trimetoprimom. Ostali rezultati prikazani su na grafikonu 2.



Grafikon 2. Rezultati zastupljenosti rezistencije na pojedine antibiotike kod sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom (izraženo u procentima)

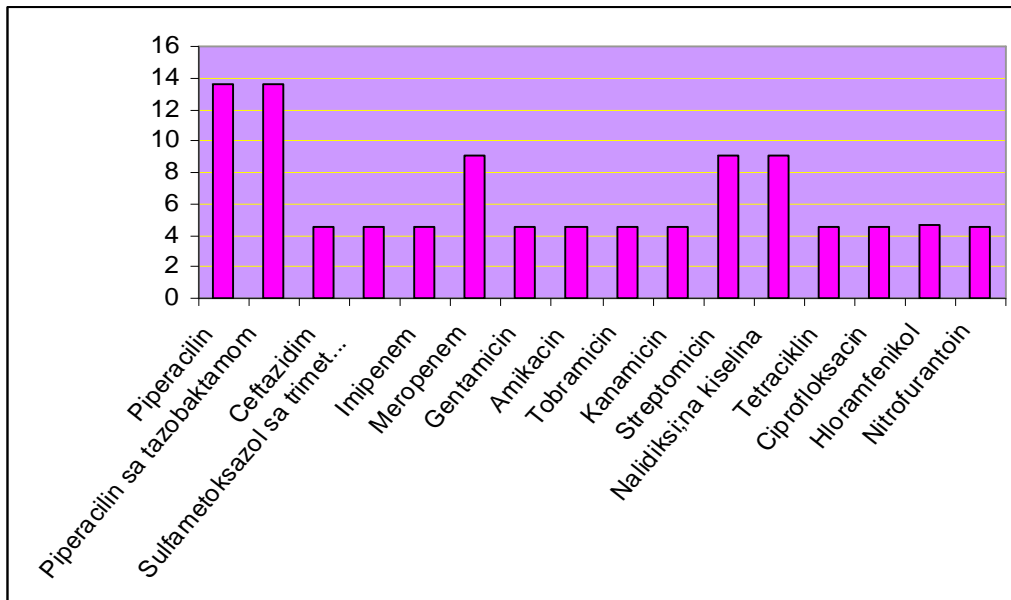
5.3.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda *Aeromonas* izolovanih od riba primenom disk difuzione metode

Od 22 soja *Aeromonas* vrsta izolovanih od šarana, 19 sojeva (86,4%) je bilo osetljivo na sve antibiotike. Kod jednog ispitanog soja poreklom od šarana nađena je rezistencija na karbapeneme i piperacilin, antibiotike koji su registrovani samo za upotrebu kod ljudi. Kod jednog soja *Aeromonas hydrophila* koji je izolovan iz akvarijumske ribice gupi, utvrđena je rezistencija na sve ispitivane antibiotike (ukupno na 16 antibiotika – tabela 13), uključujući fluorohinolone, karbapeneme, ureidopeniciline, cefalosporine III i IV generacije, hloramfenikol, tetraciklin, sulfametoksazol sa trimetoprimom i aminoglikozide.

Tabela 13. Rezultati zastupljenosti rezistentnih sojeva *Aeromonas* vrsta dobijeni na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom

	Rezistencija na:				
	1 AB	2 AB	3 AB	4 AB	16 AB
% sojeva	0	0	4.5	4.5	4.5

Najveća zastupljenost rezistencije otkrivena je na piperacilin i piperacilin sa tazobaktamom 13,6%, a najmanja od po 9,1% meropenem i nalidiksičnu kiselinu. Ostali rezultati prikazani su na grafikonu 3.



Grafikon 3. Rezultati zastupljenosti rezistencije na pojedine antibiotike kod sojeva *Aeromonas* vrsta na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom (izraženo u procentima)

5.3.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva roda *Acinetobacter* izolovanih od riba primenom disk difuzione metode

Ispitano je ukupno 6 sojeva *Acinetobacter* vrsta izolovanih od riba. Od tog broja 5 sojeva bilo je osetljivo na sve antibiotike, a jedan soj bio je rezistentan na piperacilin.

5.3.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva koji pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* izolovanih od riba primenom disk difuzione metode

Ispitano je ukupno 40 sojeva koji pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Metodom disk difuzije ustanovljeno je da je 38 sojeva (95%) bilo osetljivo na sve ispitane antibiotike. Jedan soj *Enterobacter amnigenus* bio je rezistentan na nitrofurantoin, piperacilin, aztreonam.

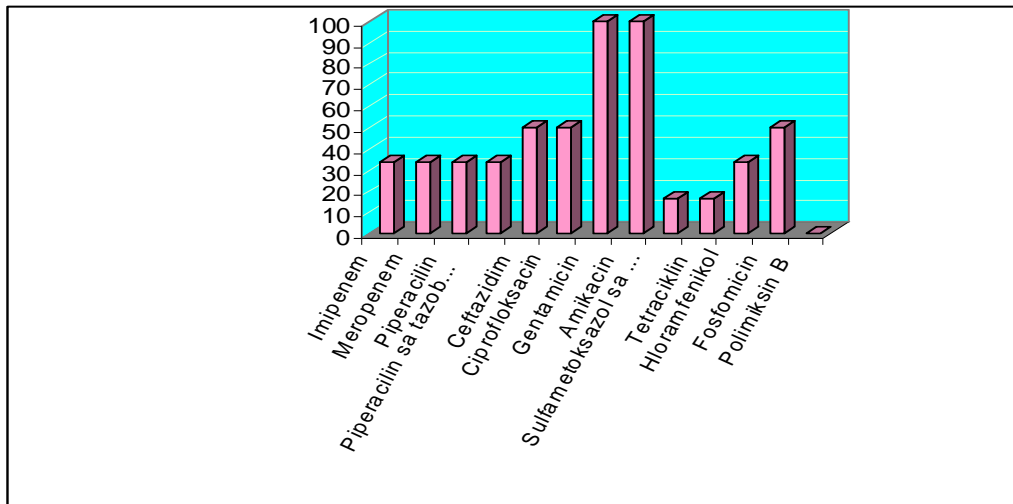
5.3.6. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike sojeva koji su sporni primenom disk difuzione metode

Za poslednjih 6 sojeva nije bilo moguće postaviti sumnju o njihovoj pripadnosti vrsti/ rodu ni posle primene visoko specifičnih metoda kao što je već navedeno. Tačnije, ovi sojevi su pripadali ili rodu *Pseudomonas* ili rodu *Stenotrophomonas*, ali jasna diferencijacija nije bila moguća. Kategoriji multirezistentnih sojeva sa otpornošću na 5, 8 i 9 antibiotika pripadalo je 5 od ovih 6 sojeva. Multirezistentnih sojeva (rezistentnih na 3 ili više antibiotika) bilo je ukupno 83,3 %. Procentualna zastupljenost sojeva rezistentnih na 1, 2 ili više antibiotika prikazana je u tabeli 14.

Tabela 14. Rezultati zastupljenosti rezistentnih sojeva među spornim sojevima dobijeni na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom

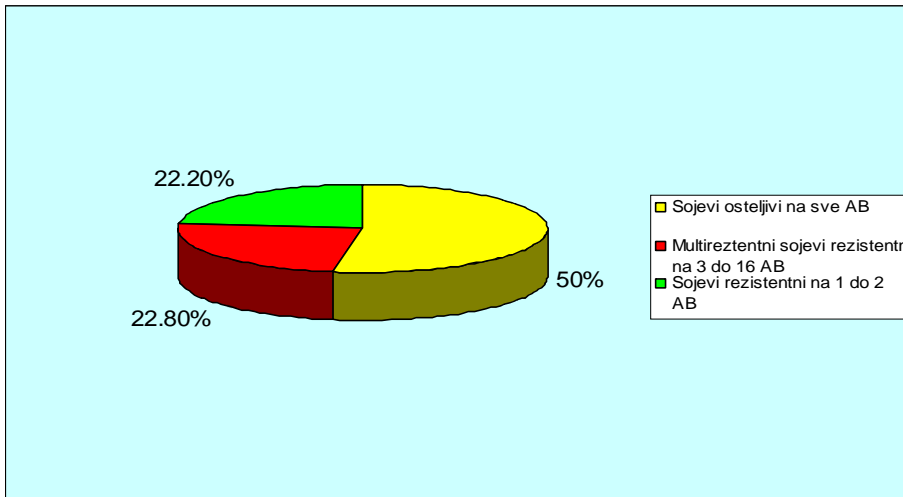
	Rezistencija na:								
	1 AB	2 AB	3 AB	4 AB	5 AB	6 AB	7 AB	8 AB	9AB
% sojeva	16,7	0	0	0	16,7	0	0	16,7	50

Najveća zastupljenost rezistencije otkrivena je na ceftazidim, piperacilin, imipenem, gentamicin i amikacin i iznosila je 83,3%, a najmanja od 16,7% na tobramicin i polimiksin B. Ostali rezultati prikazani su na grafikonu 4.



Grafikon 4. Rezultati prisustva rezistencije na pojedine antibiotike kod spornih sojeva na osnovu ispitivanja disk difuzionom metodom (izraženo u procentima)

Posmatrano na ukupan broj ispitanih sojeva u ovom istraživanju, bez obzira na rod i vrstu bakterija, ukupno je nađeno 55% sojeva koji su bili osetljivi na sve antibiotike, kod 22,8% sojeva nađena je rezistencija na 3 do 16 antibiotika uključujući i antibiotike koji se koriste isključivo kod ljudi (karbapenemi, ureidopenicilini, cefalosporini III i IV generacije). Ukupno 22,2% sojeva bilo je rezistentno na 1 do 2 antibiotika, mada je i među tim sojevima bilo onih koji su bili rezistentni na antibiotike registrovane samo za upotrebu kod ljudi (ceftazidim, piperacilin). Ovi rezultati su prikazani i u grafikonu 5.

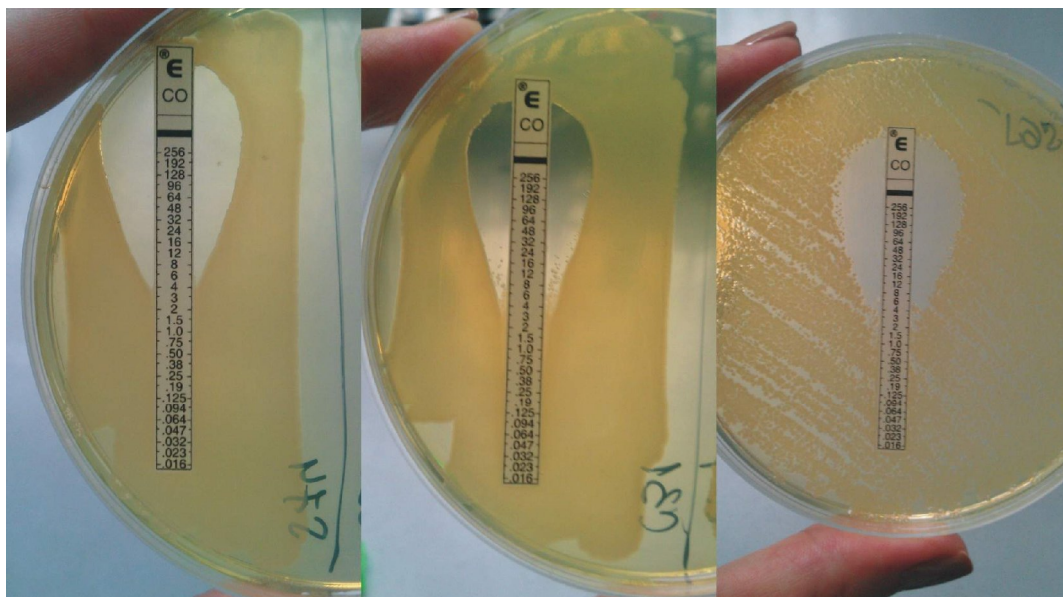


Grafikon 5. Prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti dobijenih primenom disk difuzione metode kod svih sojeva

5.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike primenom E testa

Rezultati ispitivanja rezistencije bakterija izolovanih od riba na određene antibiotike koji su od velikog značaja za humanu medicinsku praksu na koje je već utvrđena rezistencija disk-difuzionim testom, potvrđivani su primenom E testa. Kod svih sojeva kod kojih je primenom disk difuzione metode nađena rezistencija na imipenem, ceftazidim, piperacilin, piperacilin sa tazobaktamom, ciprofloksacin, hloramfenikol i fosfomicin, primenom E testa je potvrđena rezistencija tih sojeva na navedene antibiotike sa vrednostima MIK za: imipenem 12 do 32 µg/mL, ceftazidim 24 do > 256 µg/mL, piperacilin 16 do >256 µg/mL, piperacilin sa tazobaktamom 48 do >256 µg/mL, ciprofloksacin 4 do >32 µg/mL, kolistin 4 µg/mL, fosfomicin >1024 µg/mL i hloramfenikol od 6 do >32 µg/mL. Sojevi kod kojih je E testom potvrđena rezistencija na beta-laktamske antibiotike kategorisani su kao sumnjivi na prisustvo beta laktamaza proširenog spektra, karbapenemaza, metalo beta laktamaza i AmpC beta laktamaza, odnosno na gene rezistencije koji su u najvećem procentu prisutni kod superbakterija izolovanih od ljudi. Osetljivost na kolistin nije ispitivana u disk difuzionom testu zbog nepouzdanosti metode, već samo primenom E testa, što je u saglasnostima sa preoprukama EUCAST-a. Na osnovu dobijenih rezultata primenom E testa, kod 3 soja iz roda *Pseudomonas* izolovanih od šarana nađena je rezistencija na

kolistin sa dobijenim vrednostima MIK 4 $\mu\text{g/mL}$ (Slika 4). Kod svih ostalih ispitivanih sojeva vrednosti MIK kolistina iznosile su $<1 \mu\text{g/mL}$.



Slika 4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na kolistin kod 3 soja roda *Pseudomonas*

5.5. Rezultati ispitivanja prisustva beta laktamaza (KPC, MBL, OXA-48, AMPC) fenotipskom metodom potvrdnog testa Rosco Diagnostica

Na osnovu rezultata dobijenih primenom KPC/MBL,OXA-48 i AmpC fenotipskih sistema, 3 soja *Pseudomonas* vrsta bila su sumnjiva na prisustvo MBL mehanizima, 9 sojeva *Pseudomonas* vrsta na AmpC, 10 sojeva *Pseudomonas* na prisustvo OXA-48, dok nijedan soj nije pokazao fenotipsku sumnju na KPC (tabela 15). Ostale ispitivane bakterije na osnovu rezultata dobijenih primenom ovog sistema nisu bile sumnjive ni na jedan od nabrojanih mehanizama.

Tabela 15. Rezultati dobijeni fenotipskim ispitivanjem prisustva cefalosporinaza i karbapenemaza kod određenih sojeva

Oznaka soja	MBL	AmpC	OXA-48	KPC
C1	+	+	+	-
C11	+	+	+	-
C14	+	-	+	-
C18	-	+	+	-
C20	-	-	+	-
C23	-	+	+	-
C29	-	+	+	-
C37	-	+	+	-
C38	-	+	+	-
C52	-	+	+	-
C56	-	+	+	-

5.6. Rezultati ispitivanja prisustva gena za 16S rRNK metiltransferaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Tri soja *Pseudomonas aeruginosa* izolovana od šarana i jedan soj *Aeromonas hydrophila* izolovan od akvarijumske ribice (gupi) rasla su na selektivnoj podlozi sa 200 mg/l gentamicina i 200 mg/l amikacina. To znači da je vrednost MIK ovih antibiotika za nabrojane sojeve iznosila >200 µg/mL i ti sojevi su bili sumnjivi na prisustvo 16S rRNK metiltransferaza.

Kod tri soja *P.aeruginosa* koji su bili sumnjivi na prisustvo mehanizma 16S rRNK metiltransferaza, primenom metode PCR nisu nađeni geni *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE* koji kodiraju taj mehanizam. Kod soja *A. hydrophila* iz gupike potvrđen je navedeni mehanizam rezistencije nalazom gena *rmtB* koji je bio lokalizovan na transpozonu Tn1548 smeštenom na konjugabilnom plazmidu koji je po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Nalaz ovog izrazito retkog i u humanoj medicini veoma značajnog i prenosivog mehanizma rezistencije kod bakterije izolovane od ribe nije do sada prijavljen nigde u svetu. Prenosivost detektovanog (stečenog) gena rezistencije dokazana je konjugacijom *in vitro* jer su transkonjuganti *E. coli* NCTC 10538 bili rezistentni na gentamicin i amikacin. Isti mehanizam je dokazan i

transformacijom *in vitro* jer su transformanti DH5 α bili rezistentni na gentamicin i amikacin.

5.7. Rezultati ispitivanja gena za beta laktamaze proširenog spektra delovanja (TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9), OXA-1 i OXA-9 beta-laktamaze, karbapenemaze (KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58) u koje spadaju i metalo beta laktamaze (NDM, VIM, IMP, SPM, GIM), AmpC beta laktamaze metodom standardne lančane reakcije polimeraze (PCR)

Kod sojeva *Pseudomonas* koji su bili rezistentni na karbapeneme, ureidopeniciline sa i bez inhibitora beta laktamaza, kao i na cefalosporine III i IV generacije, nisu nađeni geni za KPC, NDM, M β L i AmpC beta laktamaze (VIM, IMP, TEM, SHV, SPM, GIM, CTX-M-1, CTX-M-9, OXA-1, OXA-9, OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58, AmpC grupni kao i pojedinačni-MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM).

5.8. Rezultati ispitivanja prisustva plazmida i određivanje njihove veličine

Kod ispitivanih sojeva *Pseudomonas* vrsta koji su ispoljili značajnu rezistenciju, džinovski plazmidi veličine >255 kbp detektovani su kod 16 sojeva *Pseudomonas*-a dok kod 10 multirezistentnih sojeva nije detektovano prisustvo plazmida. Ni kod jednog od ispitujućih sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* nisu nađeni plazmidi. Kod 6 spornih, nediferenciranih sojeva, nađeni su plazmidi veličine >256 kbp.

5.9. Rezultati transformacije i konjugacije

S obzirom na to da kod sojeva iz roda *Pseudomonas* koji su bili rezistentni na karbapeneme, ureidopeniciline sa i bez inhibitora beta laktamaza, kao i na cefalosporine III i IV generacije nisu utvrđeni geni rezistencije, primenom transformacije i konjugacije *in vitro* pokušano je dokazivanje moguće lokalizacije gena na mobilnim genetičkim elementima za nepoznate mehanizame rezistencije na ispitivane klase antibiotika. Stoga je obavljena transformacija *in vitro* sa ekstrahovanim plazmidima, ali nakon transformacije, transformanti DH5 α nisu postali rezistentni na ispitivane karbapeneme,

ureidopeniciline i cefalosporine. Slično tome, nakon konjugacije *in vitro* sojeva roda *Pseudomonas* kod kojih su nađeni plazmidi sa sojem *E. coli* NCTC 10538, transkonjuganti nisu postali rezistentni na ispitivane antibiotike.

6. DISKUSIJA

Širenje bakterija otpornih na antibiotike i gena odgovornih za rezistenciju kao i slučajevi otkrivanja novih R gena u akvakulturi predstavlja rastući problem i može imati veliki uticaj na zdravlje ljudi zbog povećane potražnje za proizvodima iz akvakulture. Ovakve bakterije i njihovi geni lako prelaze granice i to već dugo nije lokalni već globalni problem. Neophodno je informisati odgajivače o važnosti širenja bakterija i gena rezistencije na antibiotike i kakve sve potencijalno razarajuće posledice zloupotreba i pogrešna upotreba antibiotika mogu imati na akvakulturu, javno zdravlje ali i sve ekosisteme. Potrebno je javno promovisati koncept jednog zdravlja (One Health) koji se zasniva na zdravlju i dobrobiti ljudi, životinja i okruženja, tako da svaki odgajivač zna da posledice njegovih postupaka imaju ogroman uticaj na sva živa bića.

Voda je jedno od najvažnijih staništa bakterija i sadrži složenu mikrobnu zajednicu. Tako ne iznenađuje što različite vode takođe sadrže i bakterije koje su otporne na antibiotike. Otpornost bakterija na antibiotike je otkrivena u različitim vodenim sredinama i za neke R gene je utvrđeno da vode poreklo od vodenih bakterija. Dobar primer je skorašnja pojava plazmid posredovane hinolonske rezistencije *qnr* (Picao i sar., 2008) i rezistencija na metalo beta laktamaze CTX-M od vodene bakterije *Kluyvera* spp. (Rodriguez i sar., 2004). Kao dodatak, epidemiološki i molekularni podaci ukazuju da neki patogeni riba kao što su *Aeromonas* imaju sposobnost da šire AMR determinante sa bakterijama izolovanim od ljudi kao što je *E. coli* (Rhodes i sar., 2000; Sørum, 2006). Slično, prijavljeno je da bakterija patogena za ribe *Yersinia ruckeri* deli AMR plasmid sa AMR genima bakterije koja izaziva kugu kod ljudi *Yersinia pestis* (Welch i sar., 2007). U našem istraživanju kod soja *A. hydrophila* izolovanom iz gupi ribe (*Poecilia reticulata*) potvrđen je mehanizam rezistencije na stečene 16S rRNK metiltransferaze nalazom gena *rmtB* koji je bio lokalizovan na transpozonu Tn1548 smeštenom na konjugabilnom plazmidu koji je po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Nalaz ovog izrazito retkog i u humanoj medicini veoma značajnog i prenosivog mehanizma rezistencije kod bakterije izolovane od ribe nije do sada prijavljen nigde u svetu. Prenosivost detektovanog (stečenog) gena rezistencije dokazana je konjugacijom *in vitro* jer su transkonjuganti *E. coli* NCTC 10538 bili

rezistentni na gentamicin i amikacin. Isti mehanizam je dokazan i transformacijom *in vitro* jer su transformanti DH5 α bili rezistentni na gentamicin i amikacin.

Razvoj generacija mikroba koji su otporni na antibiotike i njihovo prenošenje u populaciji mikroba biosferom je rezultat dugogodišnjeg nepopustljivog selektivnog pritiska zbog preterane, pogrešne ili zloupotrebe antibiotika kod ljudi i životinja. Ovo nije prirodan proces, već situacija koju je čovek nametnuo prirodi; možda ne postoji bolji primer Darwinovih pojmova selekcije i opstanka.

Preterana upotreba antibiotika mora biti ograničena ili smanjena u humanoj medicini, veterinarskoj medicini, poljoprivredi a naročito u ribarstvu/akvakulturi.

Bolje tehnike poslovanja i strogi propisi o upotrebi antibiotika u terapijske svrhe kod ljudi i životinja smanjiće razvoj AMR (Midtlyng i sar., 2011).

Nove tehnike poslovanja u stočarstvu (npr. organska proizvodnja) treba detaljno ispitati kako bi bile alternativa koja pomaže smanjenju nastanka i širenja bakterija koje su otporne na antibiotike. Primer organske farme živine pokazao je značajno manji nivo bakterija otpornih na antibiotike među crevnim bakterijama kao što su *E. coli* i *Campylobacter* (Soonthornchaikul i sar., 2006). Međutim na organskoj farmi goveda nije bilo značajne razlike u tome koji su mikroorganizmi izolovani. Ali je utvrđeno da su sojevi *E. coli* i *S. aureus* koji su izolovani imali značajno nižu stopu otpornosti na antibiotike (Sato i sar., 2005).

Vakcinacija i poboljšanje higijenskih mera su među važnim temeljima u kontroli infektivnih bolesti i posledično pomoć u smanjenju broja bakterija otpornih na antibiotike (Potter i sar., 2008). Norveško ribarstvo/akvakultura može da posluži kao dobar primer. Smanjili su upotrebu antibiotika sa oko 50 tona godišnje u kasnim osamdesetim godinama prošlog veka na manje od 1000 kg godišnje posle uvođenja efikasnih vakcina protiv razarajućih bolesti riba kao što su furunkuloza ili vibrioza (NORM/NORM-VET, 2011).

Upotreba pre- i probiotika u cilju poboljšanja zdravlja i proizvodnih osobina životinja u intenzivnom uzgoju mogla bi biti dobra alternativa promotorima rasta. Ovo je važna biološka kontrola, koja ima za cilj smanjenje izbijanja infektivnih bolesti i koja bi za uzvrat imala minimalnu upotrebu antibiotika u terapijske svrhe i u stočarstvu i u ribarstvu (Callaway i sar., 2008).

Pitanje širenja i mogućeg dugoročnog povećanja broja bakterija otpornih na antibiotike i njihovih gena u različitim ekološkim nišama (Knapp i sar., 2008) treba još ispitivati u budućnosti, sa posebnim osvrtom na stvarne rizike povezane sa njima. Ipak, preduzimanje nekih mera je moguće već sada. Na primer, nekoliko metoda dezinfekcije otpada i otpadnih voda i uklanjanje mikrozagađivača, uključujući i antibiotike su već dostupne. Ovo uključuje različite hemijske dezinficijense, UV tretmane i membranske filtere. Dezinfekcija i razlaganje DNK komunalnih i bolničkih otpadnih voda mogu biti efikasne mere da bi se postiglo manje izlaganje bakterijama otpornim na antibiotike. Potrebno je uraditi još ispitivanja da bi se u potpunosti procenila inaktivacija gena rezistencije (npr. DNK otpuštena iz lizirane ćelije može biti dostupna za horizontalni transfer gena) ovim metodama (Dodd, 2012). Kombinovano uklanjanje zagađivača koji su potencijalni selektivni agensi, dezinfekcija i deaktivacija genetskog materijala, mogu biti korisne strategije u smanjenju zagađenja okruženja sa faktorima rezistencije.

Pošto je samo nekoliko novih antibiotika otkriveno u poslednjoj deceniji, buduća evolucija otpornosti bakterija na antibiotike predstavlja ozbiljnu pretnju javnom zdravlju. Hitne mere su potrebne ne samo da bi se upotreba antibiotika u profilaktičke i terapijske svrhe svela na minimum već i da bi se pronašle alternative strategije u kontroli bakterijskih infekcija.

Neizbežno, otpornost bakterija na antibiotike je postala uobičajena pojava. Bakterije su razvile višestruke mehanizme za efikasan razvoj i širenje otpornosti na antibiotike. U međuvremenu, novo razvijene brze i tačne molekularne dijagnostičke metode identifikacije i epidemiološkog nadzora genetskih determinant bakterija koje su otporne na antibiotike kod različitih domaćina i u različitim ekološkim nišama, povećavaju broj mera kojima se može kontrolisati ovaj problem. Naveli smo nekoliko potencijalnih mera koje poboljšavaju sposobnost praćenja bakterija koje su razvile otpornost na antibiotike. Međutim, izgleda da postoji jasna potreba za promenama u merama i politici ophođenja sa ovim problemom. Ove promene uključuju licenciranje lekova, finansijsku podršku, kazne i zabranu ili ograničenu upotrebu određenih lekova. Slično ovome i ponašanje onih koji prepisuju lekove treba značajno menjati. Brigu o zdravlju životinja i njihovoj higijeni takođe treba poboljšati. Pored toga, primena mikrobioloških kriterijuma za otkrivanje određenih vrsta patogena koji su otporni na antibiotike bi bila jako važna u kontroli trgovine kako životinjama namenjenim za

isranu ljudi tako i namirnicama animalnog porekla. Problem otpornosti bakterija na antibiotike u humanoj medicini neće biti rešen sve dok se nešto ne uradi da se smanji stalni priliv gena odgovornih za otpornost bakterija na antibiotike u humani mikrobiom preko lanca ishrane ili kontakta sa okruženjem. Pojava rezidua antibiotika u vodenoj sredini koje vode poreklo od terapanja ljudi, poljoprivrede, stočarstva i/ili kućnih ljubimaca dovodi do pojačanog selektivnog pritiska na bakterije u toj sredini. Razvoj otpornosti na antibiotike kod bakterija iz različitih ekoloških niša ima ogroman uticaj i može pomoći u objašnjenju kako patogeni ljudi i životinja stiču otpornost. Pored uloge laboratorija za kliničku mikrobiologiju u kojima se brzo i tačno otkriva različit broj patogena i njihovih različitih profila otpornosti, ozbiljna rutinska provera u epidemiološkim okvirima celog stočnog lanca ishrane i životne sredine mora da se uzme u obzir. Zbog ovakve složenosti kontrola bakterija otpornih na antibiotike mora da uključuje brojne aktivnosti na različitim nivoima. Buduća istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na pronalaženje za sada nepoznatih puteva prenosa bakterija otpornih na antibiotike između mikrobioma od značaja za lanac ishrane i svim mikrobiomima od značaja za patogene bakterije kada lateralno stiču gene odgovorne za otpornost na antibiotike. Na kraju, čak i uspešan integrativni pristup u svim aspektima, verovatno može samo da pomogne usporavanju širenja bakterija otpornih na antibiotike a ne na sprečavanje njihovog širenja. Sve ovo je sažeto i naglašeno u akcionom planu od 12 tačaka Evropske komisije protiv rastuće pretnje pojave i širenja otpornosti bakterija na antibiotike, koji uključuje aktivnosti na polju humane i veterinarske medicine, stočarstva, zahteve za dozvolu komercijalizacije humanih i veterinarskih lekova i drugih proizvoda, na polju istraživanja, naučnih opcija i preduzimanje mera na međunarodnom nivou u saradnji svetske zdravstvene organizacije i codex alimentarius-a FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) i OIE (World Organisation for Animal Health) (http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/does/communication_amr_2011_748_en.pdf).

Iako su u ovom istraživanju korišćene savremene metode ispitivanja koje imaju vrlo visoku specifičnost (PCR, 16s rRNK sekvenciranje gena, MALDI TOF), za ovu oblast rada, ove metode očigledno još uvek nisu dovoljno usavršene da bi u 100% slučajeva bili dobijeni precizni rezultati, odnosno, primenom nabrojanih metoda precizna diferencijacija *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* vrsta nije mogla biti uvek

postignuta. Za standardni PCR potrebno je na osnovu detaljnije analize sve više dostupnog broja genoma vrsta, koje pripadaju rodovima *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas*, pronaći genske sekvence koje nemaju sličnosti i dizajnirati nove specifičnije parove prajmera, na osnovu kojih se ovi rodovi mogu precizno razlikovati. Iako je 16S rRNA sekvenciranje gena dobro utemeljena metoda za proučavanje filogenije i taksonomije uzoraka iz složenih mikrobioma ili sredina koje je teško ili nemoguće proučavati, postoje određeni slučajevi kada je potrebno ovu metodu kombinovati sa biohemijskim ili drugim pristupima identifikacije da bi se dobio konačan odgovor. Kod MALDI TOF metode, potrebno je takođe precizno odrediti proteinske sekvence koje su jedinstvene kako za *Pseudomonas* tako i za *Stenotrophomonas* vrste.

U jednom veoma opsežnom ispitivanju koje je trajalo od 1998. do 2001. godine u SAD i kojim je bilo obuhvaćeno 76.211 sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih od pacijenata u bolnicama, ustanovljeno je da je 90 % ispitanih sojeva bilo osetljivo na amikacin i piperacilin sa tazobaktamom, 80-90% sojeva bilo je osetljivo na cefepim, ceftazidim, imipenem i meropenem i 70-80% sojeva bilo je osetljivo na ciprofloksacin, gentamicin, levofloksacin i tikarcilin sa klavulanskom kiselinom. (Karlowsky i sar., 2003). Nalazi u našem istraživanju i ako su obavljani na znatno manjem broju ispitujućih sojeva pokazuju vrlo slične rezultate.

Međutim, sve je češća pojava multirezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*, kako u humanoj, tako i veterinarskoj medicini zbog čega su u poslednjih nekoliko godina veoma popularna istraživanja delovanja nekih nesvakidašnjih kombinacija na sojeve ove bakterijske vrste. Na primer, Timurkayanak i sar., 2006 u uslovima *in vitro* tokom 2006. godine ispitivali su osetljivost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih od pacijenata u bolnicama na delovanje nekoliko kombinacija antibiotika pri čemu su kombinovali rifampicin, kolistin, doksiciklin i azitromicin. Tada je ustanovljeno da sinergističko delovanje ima samo jedna kombinacija, rifampicin sa kolisitinom. Za kolistin je poznato da efikasno deluje na sojeve roda *Pseudomonas*, ali se zbog toksičnosti retko upotrebljava, a u kombinaciji sa rifampicinom pokazao je izvanredno delovanje. Nalaz 3 soja roda *Pseudomonas* u našem ispitivanju koja su rezistentna na kolistin podiže uzburu pošto je kolistin poslednji lek izbora kod lečenja infekcija multirezistentnim sojevima roda *Pseudomonas*.

Interesantni su rezultati do kojih je došao Mišić u svojim israživanjima 2005. godine kada je kod živine otkrio 30% sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* koji su bili rezistentni na piperacilin i 33% sojeva poreklom od kobilata takođe rezistentnih na isti antibiotik. Ovaj nalaz je veoma neuobičajen ako se zna da se piperacilin uopšte ne upotrebljava kod navedenih životinjskih vrsta, odnosno u veterini ali sa stanovišta horizontalnog transfera gena rezistencije među bakterijama, ovo nije iznenađujuća pojava. Rezultati naših istraživanja ako se izuzme nalaz RmtB gena odgovornog za rezistenciju na aminoglikozide kao i nalaz sojeva koji su rezistentni na kolistin ipak u govori o manjem procentu (do 20%) sojeva rezistentnih na antibiotike.

Trogodišnje praćenje rezistencije kod bolničkih sojeva *P.aeruginosa* poreklom iz 14 Evropskih zemalja prema podacima Castanheira i sar. 2014., pokazalo je povećan broj sojeva koji produkuju metalo beta laktamaze (naročito VIM-2). Ista studija je pokazala da većina izolata nosi više od jednog mehanizma rezistencije i gde je gubitak porina OprD (koji dovodi do smanjene propustljivosti membrane) najčešći uzrok visokih MIK vrednosti. Šta više, kombinacija ovih mehanizama dovodi se u vezu sa rezistencijom na različite klase antibiotika, npr. otpornost na sve beta laktamske antibiotike ali i na hinolone i aminoglikozide. Većina ispitivanih sojeva u našem istraživanju bila je rezistentna na nekoliko različitih klasa antibiotika (beta laktamske antibiotike, aminoglikozide, hinolone i karbapeneme). Iako smo tražili veliki broj tih gena (ukupno 29 parova prajmera) osim rmtB gena ni jedan drugi gen nije nađen. Najverovatnije, su drugi mehanizmi rezistencije koji nisu stečeni zaduženi za fenotip koji smo uočili. U stvari, postoji nedostatak u vezi informacija koje se tiču osetljivosti na antibiotike kod sojeva roda *Pseudomonas* osim vrste *P.aeruginosa*. Naši nalazi ukazuju na to da različiti unutrašnji mehanizmi rezistencije mogu biti prisutni kod različitih vrsta istog roda. Pošto u ovaj rod spada veliki broj različitih vrsta, dalja istraživanja su neophodna u cilju razjašnjavanja različitosti unutrašnjih mehanizama rezistencije kod *Pseudomonada*. Ovo je u skladu sa nalazima El Amin i sar., 2005.

Na osnovu našeg istraživanja može se reći da je rasprostranjenost rezistentnih, multirezistentnih i panrezistentnih bakterija poreklom od riba iz različitih ekoloških niša ipak mala i uglavnom u vezi sa prisustvom bakterija koje imaju unutrašnju rezistenciju. Međutim, ne treba se opušitati pošto su nađeni oblici rezistencije izuzetno opasni po zdravlje ljudi i životinja. Nađeni oblici rezistencije su očigledno u ranim fazama širenja,

što dalje praćenje otpornosti bakterija na antibiotike poreklom od riba iz različitih sredina čini još značajnijim.

Što se tiče bakterija iz roda *Aeromonas* kao rezervoara klinički značajnih klasa plazmida ali i gena rezistencije, vredi pomenuti da je original IncA/C referentni plazmid pRA1 izolovan iz izolata *A. hydrophila* 1971.godine. Smatra se da su članovi IncU grupe plazmida posebno uključeni u širenje antibiotske rezistencije kod sojeva *Aeromonas* izolovanih od riba i vodenih ekosistema (Sørum i sar., 2003; Cattoir et al., 2008). Kod *A. hydrophila* izolovane od ribe gupi u našem istraživanju plazmid na kome se nalazio rmtB gen pripadao je grupi IncL/M što dodatno ukazuje na specifičnost našeg nalaza.

Većina bakterija koje imaju sposobnost da proizvode karbapenemaze rezistentne su i na imipenem i na meropenem. Smatra se da je rezistencija na imipenem kod *Pseudomonas aeruginosa* povezana sa gubitkom porina OprD u kombinaciji sa aktivnošću hromozomalnih beta laktamaza (AmpC), dok se overekspresija efluks pumpi za više lekova smatra zaduženom za rezistenciju na meropenem. Rezistencija na karbapeneme takođe može biti rezultat delovanja metalo beta laktamaza.

Međutim, u istraživanju Pragasam i sar., 2016., nađeni su retki karbapenem rezistentni fenotipovi kao što su imipenem rezistentni ali osetljivi na meropenem (IRMS) ali i meropenem rezistentni a imipenem osetljivi (MRIS). Oni su dalje detaljno ispitivani i utvrđeno je da je IRMS fenotip posledica mutacije na različitim regionima gena za porin OprD a da je MRIS fenotip nastao zbog overekspresije mexAB efluks pumpi. Takođe je potvrđeno da su ovi retki fenotipovi posledica intrinzičnih/hromozomski posredovanih mehanizama, koji nastaju kao posledica selektivnog pritiska antibiotika. Takođe je u našem istraživanju pronađeno nekoliko sojeva iz roda *Pseudomonas* koji su pokazivali IRMS ili MRIS fenotip ali zbog nedostataka mogućnosti ovi sojevi nisu dalje tako detaljno ispitivani.

Godišnje se globalno trguje sa preko milijardu akvarijumskih ribica (Whittington i Chong, 2007). Ova brzo rastuća industrija povezana je sa brigom o javnom zdravlju zbog preobimne upotrebe antibiotika praćene povećanom antimikrobnom rezistencijom.

Više istraživanja koja uključuju sekvenciranja celih plazmida su nepohodna da bi se razumela epidemiologija i evolucija raširenosti plazmid posredovane rezistencije u

vodenim ekosistemima. Imajući u vidu brz rast akvakulture kao poljoprivredne grane, neophodni su dalji napori u sprečavanju razvoja i širenju antimikrobne rezistencije u akvakulturi da bi se smanjio rizik po zdravlje ljudi.

7. ZAKLJUČCI

1. Zbog izražene intrinzične rezistencije na veliki broj različitih antibiotika kod bakterija iz rodova *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas*, u cilju pravilnog izbora antibiotika i adekvatne interpretacije rezultata ispitivanja njihove osetljivosti, neophodna je precizna identifikacija ovih vrsta koja nije uvek moguća primenom konvencionalnih metoda.
2. Za identifikaciju određenih vrsta bakterija izolovanih od riba ni kombinovana primena savremenih molekularnih metoda kao i MALDI-TOF MS nije dala jasne rezultate s obzirom da u bazama podataka još nema deponovanih svih genskih i proteinskih sekvenci poreklom od svih vrsta bakterija koje su sastavni deo mikrobioma riba.
3. Zbog nedostatka podataka o stečenoj i intrinzičnoj rezistenciji, kao i o graničnim vrednostima zona inhibicije, vrednostima MIK i interpretativnim kategorijama, ispitivanje osetljivosti na antibiotike još uvek nije moguće kod većine vrsta bakterija izolovanih od riba.
4. Ispitivanje fenotipske rezistencije na beta-laktamske antibiotike (ureidopeniciline, cefalosporine III i IV generacije i karbapeneme) nije dovoljno pouzdano za primenu kod bakterija izolovanih od riba, jer kod sojeva koji su ispoljili ovu rezistenciju nije utvrđeno prisustvo nijednog gena koji kodira rezistenciju, odnosno gena koji bi potvrdio mehanizam rezistencije.
5. Na izolovanim plazmidima nije utvrđeno prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na beta-laktamske antibiotike, pa nije dokazana prenosivost ove rezistencije.
6. Kod soja *A. hydrophila* izolovanog iz gupi akvarijumske ribice primenom metode PCR potvrđen je mehanizam rezistencije na aminoglikozide - 16S rRNK metiltransferaza detekcijom gena *rmtB* lokalizovanog na transpozonu Tn1548 koji je smešten na konjugabilnom plazmidu koji je po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Ovo je u oblasti akvakulture prvi nalaz kod nas i u svetu ovog izrazito retkog i u humanoj medicini veoma značajnog i prenosivog mehanizma rezistencije.

7. Iako nije dokazano prisustvo gena rezistencije na beta laktamske antibiotike, nalaz rezistencije na 3 do 16 antibiotika uključujući i antibiotike koji se koriste isključivo kod ljudi (karbapenemi, ureidopenicilini, cefalosporini III i IV generacije) kod 22,8% sojeva iz roda *Pseudomonas*, značajan je sa aspekta javnog zdravlja, jer je *Pseudomonas* oportunistički patogen i potencijalno je opasan za ljude i životinje.
8. Izuzetno je značajan nalaz rezistencije kod 3 soja iz roda *Pseudomonas* na kolistin koji je kategorisan kao antibiotik poslednje linije odbrane u lečenju ljudi od infekcija izazvanih multirezistentnim i panrezistentnim superbakterijama.

8. SPISAK LITERATURE

1. Aarestrup F.M. (2000) Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS* 101:1-48.
2. Aarestrup F.M. (2006) Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press.
3. Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Emborg H.D., Pedersen K., Hendriksen R.S. and Bager, F. (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2054–2059.
4. Akinbowale O.L., Peng H., Barton M.D. (2007) Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol* 103:2016-2025.
5. Alexander, T.W., Yanke, J.L., Reuter, T., Topp, E., Read, R.R., Selinger, B.L., et al. (2011) Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics. *BMC Microbiol.* 11:19. doi: 10.1186/1471-2180-11-19.
6. Altinok I, Kayis S, Capkin E. (2006) *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* 261:850-855.
7. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
8. Anderson E.S. (1968) The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Annu Rev Microbiol* 22:131-180.
9. Angulo, F.J., Nargund, V.N., and Chiller, T.C. (2004) Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med. B* 51, 374–379.
10. Araoju R.M., Arribas R.M., Pares R. (1991) Distribution of *Aeromonas* species in waters with different level of pollution. *J Appl Bacteriol* 71:182-186.

11. Arya, S.C., and Agarwal, N. (2011) International travel with acquisition of multi-drug resistant Gram negative bacteria containing the New Delhi metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1). *Travel Med. Infect. Dis.* 9, 47–48.
12. Baquero F., Alvarez-Ortega C., and Martinez J. L. (2009) Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 469–476.
13. Baquero F., Martinez J.-L., and Canton R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.
14. Baraniak A., Fiett J., Sulikowska A., Hryniewicz W., Gniadkowski M. (2002) Countrywide spread of CTXM-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:151-9.
15. Bartoloni A., Benedetti M., Pallecchi L., Larsson M., Mantella A., Strohmeyer M., Bartalesi F. et al. (2006) Evaluation of a rapid screening method for detection of antimicrobial resistance in the commensal microbiota of the gut. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100:199-125.
16. Bennett J.W., Herrera M.L., Lewis J.S. II et al. (2009) KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 292–294.
17. Bergquist P.L., (1987) Incompatibility, in: *Plasmids: A Practical Approach* (K.G. Hardy, ed.), IRL Press, Oxford, pp. 37–78.
18. Blaak H., van Hoek A.H., Veenman C., Docters van Leeuwen A.E., Lynch G., van Overbeek W.M., de Roda Husman A.M. (2014) Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int J Food Microbiol* 168-169:8-16.
19. Blackburn J.K., Mitchell M.A., Blackburn M.C.H., Curtis A., Thompson B.A. (2010) Evidence of Antibiotic Resistance in Free-Swimming, Top-Level Marine Predatory Fishes *J. Zoo Wildl Med*, 41(1):7-16.
20. Brown S., Bantar C., Young H.K., and Amyes S.G.B. (1998) Limitation of *Acinetobacter baumannii* treatment by plasmid-mediated carbapenemase ARI-2. *Lancet* 351, 186–187.
21. Brooke J.S. (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 25:2-41.

22. Bueno M.F., Francisco G.R., O'Hara J.A., de Oliveira Garcia D., Doi Y. (2013) Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2397-400.
23. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2227-38.
24. Cabello F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137–1144.
25. Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., Buschmann A.H. (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* 15:1917-1942.
26. Cabello F.C., Godfrey H.P., Buschmann A.H., Dölz H.J. (2016) Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* April [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6).
27. Cain C.C., Lee D., Waldo H.R., Henry T.A., Casida Jr J.E., Wani C.M., Wall E.M., Oberlies H.N., Falkinham O.J. (2003) Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2113-2117.
28. Callaway T.R., Edrington T.S., Anderson R.C., Harvey R.B., Genovese K.J., Kennedy C.N., Venn D.W., Nisbet D.J. (2008) Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res Rev.* 217-25.
29. Cantas L., Shah S.Q.A., Cavaco L.M., Manaia C., Walsh F., Popowska M., Garelick H., Bürgmann H., Sørum H. (2013) A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota, *Frontiers in Microbiology* 4, 96.
30. Cantas L., Le Roux F., Mazel D., and Sørum H. (2012a) Impact of Antibiotics on the Expression of the tra Genes and on the Host Innate Immune Gene Activity

- during SXT Element Bearing *Aeromonas salmonicida* Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). PSN-ICAAC12PS1-B-1330. San Francisco, CA
31. Cantas L., Midthlyng P.J., and Sørum H. (2012c) Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Microbiol.* 12:37. doi: 10.1186/1471-2180-12-37
 32. Cantas L., Torp J.R., Alestrøm P., and Sørum H. (2012b) Cultureable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish* 9, 26–37.
 33. Cao L., Naylor R., Henriksson P., Leadbitter D., Metian M., Troell M., Zhang W. (2015) Global food supply: China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science* 347:133-135.
 34. Castanheira M., Deshpande L. M., Costello A., Davies T.A. and Jones R.N. (2014) Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.* 69(7):1804-14.
 35. Cattoir V., Poirel L., Aubert C., Soussy C.J., Nordmann P. (2008) Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis.* 14(2):231-7.
 36. Chatterjee S., Haldar S. (2012) *Vibrio* Related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J Marine Sci Res Dev* S1:002.
 37. Chikwendu C.I., Ibe S.N., Okpokwasili G.C. (2014) Multiple antimicrobial resistance in *Vibrio* spp isolated from river and aquaculture water sources in Imo state, Nigeria. *Br Microbiol Res J* 4:560-569.
 38. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) M100-S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. *CLSI* Wayne, Pennsylvania.
 39. Cohen M.L. (1992) Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 157:1050-1055.
 40. Crowfoot D.; Bunn Charles W.; Rogers-Low Barbara W.; Turner-Jones Annette (1949) "X-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin". *In*

- Clarke, H. T.; Johnson, J. R.; Robinson, R. (ed). *Chemistry of Penicillin*. Princeton University Press. 310–367.
41. Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nubel U., Ohlsen K., et al. (2010) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 109–117.
 42. Czekalski N., Berthold T., Caucci S., Egli A., and Burgmann H. (2012) Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3:106.
 43. Dang H., Ren J., Song L., Sun S., An L. (2008) Dominant chloramphenicol resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. *World J Microbiol Biotechnol* 24:209-217.
 44. Davies J., Davies D., (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 3, 417-433.
 45. Davies J. (1995) Vicious circles: looking back on resistance plasmids. *Genetics* 139:1465-1468.
 46. Davis M.A., Baker K.N., Orfe L.H., Shah D.H., Besser T.E., Call D.R. (2010) Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:2666-9.
 47. Deng Y., He L., Chen S., Zheng H., Zeng Z., Liu Y., Sun Y., Ma J., Chen Z., Liu J.H. (2011a) F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*bla*CTX-M-9 group genes and *rmtB-qepA* in *Enterobacteriaceae* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:4926-9.
 48. Deng Y., Zeng Z., Chen S., He L., Liu Y., Wu C., Chen Z., Yao Q., Hou J., Yang T., Liu J.H. (2011b) Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clin Microbiol Infect.* 17:1740-5.
 49. Dobiasova H., Kutilova I., Piackova V., Vesely T., Cizek A., Dolejska M. (2014) Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Vet Microbiol.* 171(3-4):413-21.
 50. Dodd M.C. (2012) Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J. Environ. Monit.* 14, 1754–1771.

51. Doi Y., Yokoyama K., Yamane K., Wachino J., Shibata N., Yagi T., Shibayama K., Kato H., Arakawa Y. (2004) Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:491-6.
52. Doi Y. and Arakawa Y. (2007) 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 45 (1): 88-94.
53. Doi Y., Adams J.M., Yamane K., Paterson D.L. (2007b) Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:4209-10.
54. Doi Y., de Oliveira Garcia D., Adams J., Paterson D.L. (2007c) Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:852-6.
55. Dolejska M., Villa L., Hasman H., Hansen L., Carattoli A. (2013) Characterization of IncN plasmids carrying *bla*CTX-M-1 and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother.* 68:333-9.
56. Dortet L., Poirel L., Al Yaqoubi F., Nordmann P. (2012) NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect.* 18:E144-8.
57. El Amin N., Giske C.G., Jalal S., Keijsers B., Kronvall G., Wretling B. (2005) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS.* 113(3):187-96.
58. Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., and Spratt B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:7687-7692.
59. EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.
60. EUCAST and Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2015.

61. EUCAST - Consultation on proposal to reduce colistin breakpoints for *Pseudomonas aeruginosa* to susceptible ≤ 2 mg/L, resistant > 2 mg/L, maj 2016.
62. European Medicines Agency (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013. Fifth ESVAC report ESVAC. EMA/387934/2015. London: EMA; 2015.
63. Falagas M.E., Kastoris A.C., Vouloumanou E.K., Rafailidis P.I., Kapaskelis A.M., Dimopoulos G. (2009) Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiol* 4:1103-1109.
64. Fallah F., Noori M., Hashemi A., Goudarzi H., Karimi A., Erfanimanesh S., and Alimehr S. (2014) Prevalence of *bla*_{NDM}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran. *Scientifica*, vol. 2014, Article ID 245162, 6 pages.
65. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Rome.
66. Farmed Fish Health Report. (2010). "Norwegian Veterinary Institute," in *The Health Situation in Norwegian Aquaculture 2010*, eds G. Bornø and C. Sviland (Oslo: Norwegian Veterinary Institute).
67. Ferreira da Silva M., Tiago I., Verissimo A., Boaventura R.A.R., Nunes O.C., and Manaia C.M. (2006) Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 322–329.
68. Ferreira da Silva M., Vaz-Moreira I., Gonzalez-Pajuelo M., Nunes O.C., and Manaia C.M. (2007) Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 166–176.
69. Fontes L.C., Neves P.R., Oliveira S., Silva K.C., Hachich E.M., Sato M.I., Lincopan N. (2011) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3063-4.
70. Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., and Dantas G. (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111.
71. Fosse T., Giraud-Morin C., Madinier I., Mantoux F., Lacour J.P., Ortonne J.P. (2004) *Aeromonas hydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum β -

- lactamase TEM-24 and three chromosomal class B, C, and D β -lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2342-2343.
72. Galimand M., Courvalin P., Lambert T. (2003) Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2565-71.
 73. Galimand M., Courvalin P., Lambert T. (2012) RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:3960-2.
 74. Gallo S.W., Ramos P.L., Sanchez F.C.A., Oliveira S.D. (2013) A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(3): 390–391.
 75. Geyer C.N. and Hanson N.D. (2013) Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 77(2): 113–117.
 76. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., and Dowling P.M. (2007) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ames; Oxford: Iowa State University Press.
 77. Gilliver M.A., Bennett M., Begon M., Hazel S. M., and Hart C.A. (1999) Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* 401:233.
 78. Gobat P.F., Jemmi T. (1993) Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 20:117-120.
 79. Gonzales-Zorn B., Teshager T., Casas M., Porerro M., Moreno M., Courvalin P., Domioniguez L. (2005) *armA* and Aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerging Infectious diseases* 11:954-956.
 80. Gopee N.V., Adesiyu A.A., and Caesar K. (2000) A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds, and reptiles in Trinidad. *J. Zoo Wildl. Med* 31:353–360.
 81. Grave K., Torren-Edo J., and Mackay D. (2010) Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J. Antimicrob. Chemother*. 65, 2037–2040.

82. Grigorakis K, Rigos G. (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare-the case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 85:899-919.
83. Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilback C., Sandegren L., Hughes D., et al. (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7:e1002158. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158.
84. Halverson M. (2000) *The Price We Pay for Corporate Hogs*. Minneapolis, MN: Institute for Agriculture and Trade policy, 32.
85. Hammerum A.M., Heuer O.E., Emborg H.D., Bagger-Skjot L., Jensen V.F., Rogues A.M., et al. (2007) Danish integrated antimicrobial in resistance monitoring and research program. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1632–1639.
86. Han F., Walker R.D., Janes M.E, Prinyawiwatkul W., Ge B. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Appl Environ Microbiol* 73:7096-7098.
87. Heuer O.E., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I., and Angulo F.J. (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1248–1253.
88. Hoa P.T.P., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D.H., et al. (2011) Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.* 409, 2894–2901.
89. Holmes A.J., Holley M.P., Mahon A., Nield B., Gillings M., Stokes H.W. (2003) Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri*. Populations in Soil. *J Bacteriol* 185:918-928.
90. Hopkins K.L., Escudero J.A., Hidalgo L., Gonzalez-Zorn B. (2010) 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis.* 16:712-5.
91. Horton R.A., Randall L.P., Snary E.L., Cockrem H., Lotz S., Wearing H., et al. (2011) Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3715–3719.
92. http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/does/communication_amr_2011_748_en.pdf

93. <http://europa.eu>
94. <http://rapidcell.proteinreader.com/maldi-msms-biotypization-protocol/>
95. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp
96. <http://www.govtrack.us/congress/bills/109/s742>
97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
98. http://www.ssb.no/fiskeoppdrett_en/
99. Hu L.F., Chang X., Ye Y., Wang Z.X., Shao Y.B., Shi W., Li X., Li J.B. (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents* 37:230-234.
100. Isenberg H.D. (Ed.) (2004) Aerobic bacteriology. In: Isenberg HD (Ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol.1. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA*
101. Jacobs L., Chenia H.Y. (2007) Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol* 114:295-306.
102. Janda JM, Abbott SL. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35-73.
103. Jamali S., Shahid M., Farrukh S., Singh A., Khan H.M. (2015) Molecular characterization of genes encoding AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *J App Pharm Sci.* 5(10): 048-051.
104. Jensen L.J., Skovgaard M., Sicheritz-Pontén T., Hansen N.T., Johansson H., Jørgensen M.K., Kiil K., Hallin P.F., Ussery D. (2004) Comparative genomics of four *Pseudomonas* species. In: Ramos JL, ed. *Pseudomonas: Genomics, Lifestyle and Molecular architecture*. New-York: Kluwer Academic Plenum. p 139-163.
105. Jiang H.X., Tang D., Liu H.Y., Zhang X.H., Xu L., Hawkey P. (2012) Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (10): 2350-2353.

106. Jin J.S., Kwon K.T., Moon D.C., Lee J.C. (2009) Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 33:490-1.
107. Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Johnson S.J., Logue C.M., White D.G., Doetkott C., Nolan L.K. (2007) Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 73:1976-83.
108. Karlowsky A.J., Draghi C.D., Jones E.M., Thornsberry C., Friedland R.I., Sahn F.D. (2003) Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1681-1688.
109. Klugman K.P. (2002) Bacteriological evidence of antibiotic failure in pneumococcal lower respiratory tract infections. *Eur. Respir. J.* 20, 3S-8S.
110. Kluytmans J.A.J.W. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 11-15.
111. Knapp C.W., Engemann C.A., Hanson M.L., Keen P.L., Hall K.J., Graham D.W. (2008) Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. *Environ Sci Technol*. 42(14):5348-53.
112. Korczak D., Schöffmann C. (2012) Medical and health economic evaluation of prevention- and control measures related to MRSA infections or -colonisations at hospitals. *GMS Health Technol Assess.* 6: Doc4.
113. Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester; 115-175.
114. Lang A.B., Horn M.P., Imboden M.A., Zuercher A.W. (2004) Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. *Vaccine* 22:44-48.
115. Hidalgo L., Gutierrez B., Ovejero C.M., Carrilero L., Matrat S., Saba C.K.S., Santos-Lopez A., Thomas-Lopez D., Hoefler A., Suarez M., Santurde G., Martin-Espada C., and Gonzalez-Zorn B. (2013) *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11

- from Companion Animals Bearing ArmA Methyltransferase, DHA-1 β -Lactamase, and QnrB4. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(9): 4532–4534.
116. Leclercq R., Canto'n R., Brown D.F.J., Giske C.G., Heisig P., MacGowan A.P., Mouton J.W., Nordmann P., Rodloff A.C., Rossolini G.M., Soussy C.J., Steinbakk M., Winstanley T.G., Kahlmeter G. (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, *Clin Microbiol Infect* 19: 141–160.
 117. Lederberg J., Tatum E.L. (1946) "Gene recombination in *E. coli*". *Nature* 158 (4016): 558.
 118. Lederberg J., Lederberg E.M., Zinder N.D., Lively E.R. (1951) Recombination analysis of bacterial heredity. Cold Spring Harb *Symp Quant Biol.* 16:413–443.
 119. Lederberg J. (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev* 11/1952; 32: 403-430
 120. Levy S.B., and Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, 122–129
 121. Libisch B., Giske C.G., Kovács B., To'th T.G., Füzi M. (2008) Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol* 46:1878-1880.
 122. Liu J.H., Deng Y.T., Zeng Z.L., Gao J.H., Chen L., Arakawa Y., Chen Z.L.(2008) Coprevalence of plasmidmediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52:2992-3.
 123. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2):161-8.
 124. Livermore D.M., Walsh T.R., Toleman M., Woodford N. (2011b) Balkan NDM-1: escape or transplant? *LancetInfect Dis.* 11:164.
 125. Ma L., Lin C.J., Chen J.H., Fung C.P., Chang F.Y., Lai Y.K., Lin J.C., Siu L.K. (2009) Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance Project. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella*

- pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:104-11.
126. Marmur J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-18, 1961.
 127. Marshall B.M., and Levy S.B. (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733.
 128. Martinez J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902.
 129. Maravić A., Skočibušić M., Fredotović Ž., Cvjetan S., Šamanić I., Puizina J. (2014) Characterization of environmental CTX-M-15-producing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6333-6334.
 130. McEwen S.A. (2006) Antibiotic use in animal agriculture: what have we learned and where are we going? *Anim. Biotechnol.* 17, 239–250.
 131. McIntosh D., Cunningham M., Ji B., Fekete F.A., Parry E.M., Clark S.E., Zalinger Z.B., Gilg I.C., Danner G.R., Johnson K.A., Beattie M., Ritchie R. (2008) Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother* 61:1221–1228.
 132. Michael I., Rizzo L., McArdell C.S., Manaia C.M., Merlin C., Schwartz T., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47, 957–995.
 133. Midtlyng P.J., Grave K., and Horsberg T.E. (2011) What has been done to minimize the use of antibacterial and antiparasitic drugs in Norwegian aquaculture. *Aquac. Res.* 42, 28–34.
 134. Miriagou V., Carattoli A., Fanning S. (2006) Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection* 8:1923-1930.
 135. Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., Galani I., Giske C.G., Gniadkowski M., Malamou-Lada E., Martinez-Martinez L., Navarro F., Nordmann P., Peixe L., Pournaras S., Rossolini G.M., Tsakris A., Vatopoulos A. and Cantón R. (2010)

- Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 112–122.
136. Mišić D. (2005) Ispitivanje efikasnosti antimikrobnih lekova *in vitro* na nekim patogenim bakterijama izolovanim od domaćih životinja. Magistarska teza, Beograd, 2005.
137. Mišić D. (2008) Ispitivanje prisustva gena rezistencije na plazmidima izolovanim iz multirezistentnih sojeva *E.coli*, *Salmonella* i *Pseudomonas* vrsta poreklom od domaćih životinja. Doktorska disertacija, Beograd, 2008.
138. Mitchell M.A., Roy A., Vennen K., Heatley J.J., and Tully T.N. (2001) Antibiotic-resistance patterns of microbes isolated from raptors from Louisiana. Orlando, Florida. Proc. 22nd Annu. Conf. Assoc. Avian Vet.
139. Moubareck C., Brémont S., Conroy M.C., Courvalin P., Lambert T. (2009) GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3579–3581.
140. Moura A., Henriques I., Smalla K., and Correia A. (2010) Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66.
141. Mushtaq S., Irfan S., Sarma J.B., Doumith M., Pike R., Pitout J., Livermore D.M., Woodford N. (2011) Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 66:2002-5.
142. Naas T., Poirel L., Nordmann P. (2008) Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 1 (14): 42–52.
143. Neuwirth C., Siebor E., Robin F., Bonnet R. (2007) First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*; IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4486-4488.
144. Ndi O., and Barton M. (2012) “Antibiotic resistance in animals—The Australian perspective,” in *Antimicrobial Resistance in the Environment*, eds P. L. Keen and M. H. H. M. Montforts (New Jersey, NJ: Wiley-Blackwell), 265–290.
145. Nikolaou K.C., and Montagnon T. (2008) *Molecules that changed the world*. Wiley VCH, Weinheim, Germany.
146. Nordmann P., Cuzon G., Naas T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9: 228–236.

147. Nordmann P., Dortet L., and Poirel L. (2012) Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol. Med.* 18, 263–272.
148. NORM/NORM-VET. (2011) *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo 2012. ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (electronic). (Tromsø/Oslo: Norwegian Veterinary Institute). Available online at: <http://www.vetinst.no/eng/Publications/Norm-Norm-Vet-Report/Norm-Norm-Vet-rapporten-2010>
149. Novo A., and Manaia C.M. (2010) Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1157–1166.
150. Novo A., André S., Viana P., Nunes O.C., and Manaia C.M. (2013) Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* 47, 1875–1887.
151. O'Hara J.A., McGann P., Snedrud E.C., Clifford R.J., Waterman P.E., Lesho E.P., Doi Y. (2013) Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2413-6.
152. Oberlé K., Capdeville M., Berthe T., and Petit F. (2012) Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1859–1868.
153. Olliver A., Vallé M., Chaslus-Dancla E., and Cloeckaert A. (2005) Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 289–301.
154. Picão R.C., Poirel L., Demarta A., Silva C.S., Corvaglia A.R., Petrini O., Nordmann P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother.* 62(5):948-50.
155. Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P. (2011b) Genetic features of *bla*NDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:5403-7.

156. Poirel L., Cattoir V., Nordmann P. (2012) Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 3:24.
157. Pérez-Pérez F.J., Hanson N.D.(2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153-62
158. Perrin-Guyomard A., Bruneau M., Houée P., Deleurme K., Legrandois P., Poirier C., et.al. (2016) Prevalence of mcr-1 in commensal Escherichia coli from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill.* 11; 21(6) : pii = 30135.
159. Piotrowska M., Popowska M. (2015) Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Front Microbiol* 6:494.
160. Poirel L., Liard A., Rodriguez-Martinez J.M., and Nordmann P. (2005) Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1118–1121.
161. Potter A., Gerdt V., Littel-van den Hurk Sv. (2008) Veterinary vaccines: alternatives to antibiotics? *Anim Health Res Rev.* 9(2):187-99.
162. Pragasam A.G., Raghavivedha M., Anandan S., and Veeraraghavan B. (2016) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with discrepant carbapenem susceptibility profile. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15: 12.
163. Pratt R. (2010) Preparation for a post antibiotic era must start now. *Nurs. Times* 106, 26.
164. Queenan A.M., Bush K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440–458.
165. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly J.W., Leonard C.F. (2002) Veterinary Microbiology and Microbial Disease. *Blackwell Publishing*, Ames, Iowa.
166. Rico A., Phu T.M., Satapornvanit K., Min J., Shahabuddin A.M., Hebruksson P.J.G., Murray F.J., Little D.C., Dalsgaard A., Van den Brink P.J. (2013) Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture* 412-413:231-243.
167. Rizzo L., Manaia C. M., Merlin C., Schwartz T., Dagot D., Ploy M.C., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant

- bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360.
168. Rhodes G., Huys G., Swings J., McGann P., Hiney M., Smith P., Pickup R.W. (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol* 66:3883-3890.
169. Rodríguez M.M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Ayala J.A. and Gutkind G. (2004) Chromosome-Encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a Possible Origin of Plasmid-Borne CTX-M-1-Derived Cefotaximases *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12): 4895–4897.
170. Roe M.T., and Pillai S.D. (2003) Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poult. Sci.* 82, 622–626.
171. Sato K., Bartlett P.C., and Saeed M.A. (2005) Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226:589-594.
172. Schluter A., Heuer H., Szczepanowski R., Poler M.S., Schneiker S., Puhler A., Top M.E. (2005) Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1 β plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein. *Plasmid* 54:135-148.
173. Segura P. A., Francois M., Gagnon C., and Sauve S. (2009) Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ. Health Perspect.* 117, 675–684.
174. Shah N.S., Wright A., Bai G.H., Barrera L., Boulahbal F., Martin-Casabona N., Drobniewski F., Gilpin C., Havelkova M., Lepe R., Lumb R., Metchock B., Portaels F., Rodrigues M.F., Rusch-Gerdes S., Deun A.V., Vincent V., Laserson K., Wells C., and Cegielski J.P. (2007) Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis.* 13:380-387.
175. Shah S.Q.A., Karatas S., Nilsen H., Steinum T.M., Colquhoun D.J., and Sørum H. (2012a) Characterization and expression of the *gyrA* gene from quinolone resistant *Yersinia ruckeri* strains isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Aquaculture* 350–353, 37–41.

176. Shah S.Q.A., Colquhoun D.J., Nikuli H.L., and Sørum H. (2012b) Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8672–8679.
177. Shanmugam P., Meenakshisundaram J., Jayaraman P., (2013) bla_{KPC} gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res.* 7(12): 2736–2738.
178. Sheehan J., and Henery-Logan K.R. (1959) The total synthesis of penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* 81:3089-3094.
179. Smith P.R., Le Breton A., Horsberg T.E., and Corsin F. (2009) “Guidelines for antimicrobial use in aquaculture,” in *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, eds L. Guardabassi L.B. Jensen, and H. Kruse (Oxford: Blackwell Publishing Ltd.), 207–218.
180. Skov R.L., Monnet D.L. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21(9) : pii = 30155. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
181. Solé M., Pitart C., Roca I., Fàbrega A., Salvador P., Muñoz L., Oliveira I., Gascón J., Marco F., Vila J. (2011) First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:4402-4.
182. Soonthornchaikul N. and Garelick H. (2009) Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Species Isolated from Edible Bivalve Molluscs Purchased from Bangkok Markets, Thailand. *Foodborne Pathogens and Disease.* 6(8): 947-951.
183. Soonthornchaikul N., Garelick H., Jones H., Jacobs J., Ball D., and Choudhury M. (2006) Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated from intensively and organically reared chickens purchased from retail outlets. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 125–130.
184. Sørum H. (2000) Farming of Atlantic salmon – an experience from Norway. *Acta Vet Scand Suppl.* 93:129-134.
185. Sørum H. (2006) Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup F., ed. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, DC, USA: *American Society for Microbiology Press.* p 213-238.

186. Sørum H. (2008) Antibiotic resistance associated with veterinary drug use in fish farms. In: Lie Ø, ed. *Improving Farmed Fish Quality and Safety*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p. 157-182.
187. Sørum H., L'Abée-Lund T.M., Solberg A., Wold A. (2003) Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(4):1285-90.
188. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., Li Puma J.J. (2004) PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients, *J Clin Microbiol* 2004, 42(5): 2074–2079.
189. Srinivasan V., Gillespie E.B., Lewis J.M., Nguyen T.L., Headrick I.S., Schukken H.Y., Oliver P.S. (2007) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary Microbiology* 124: 319-328.
190. Summers KD (1996) The biology of plasmids. *Blackwell Science Ltd*, UK, ISBN: 0-632-03436-X.
191. Sundin G.W., Monks D.E., and Bender C.L. (1995) Distribution of the streptomycin-resistance transposon Tn5393 among phylloplane and soil bacteria from managed agricultural habitats. *Can. J. Microbiol.* 41, 792–799.
192. Swann M.M. (1969) *Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine (Swann Report)*. London: HMSO.
193. Tacão M., Correia A., Henriques I. (2012) Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of *bla*CTX-M-like genes. *Appl Environ Microbiol* 78:4134-4140.
194. Thorrold C.A., Letsoalo M.E., Duse A.G., Marais E. (2007) Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E.coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal of Food Microbiology* 113:315-320.
195. Tijet N., Andres P., Chung C., Lucero C.; WHONET-Argentina Group, Low D.E., Galas M., Corso A., Petroni A., Melano R.G. (2011) *rmtD2*, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in *Enterobacteriaceae* isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:904-9.

196. Timurkaynak F., Can F., Azap K.O., Demirbilek M., Arslan H., Karaman O.S. (2006) In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27:224-228.
197. van Delden C. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them? *Int J Antimicrob Agents*.30 1 : S71-5.
198. van den Bogaard A.E., London N., Dreissen C., Sobberingh E.E. (2001) Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughters. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 47:763-771.
199. van Duijkeren E., Wannet B.J.W., Houwers J.D., van Pelt W. (2002) Serotype and phage type distribution of Salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 40:3980-3985.
200. Verner-Jeffreys D.W., Welch T.J., Schwarz T., Pond M.J., Woodward M.J., Haig S.J., Rimmer G.S., Roberts E., Morrison V., Baker-Austin C. (2009) High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS One* doi:10.1371/journal.pone.0008388.
201. Walsh T.R., Stunt R.A., Nabi J.A., MacGowan A.P., Bennett P.M. (1997) Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother* 40:171-178.
202. Walsh T.R. (2008) Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 21: 367–371.
203. Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., and Toleman M.A. (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 355–362.
204. Wachino J., Arakawa Y. (2012) Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 15:133-48.

205. Wachino J., Shibayama K., Kurokawa H., Kimura K., Yamane K., Suzuki S., Shibata N., Ike Y., Arakawa Y. (2007) Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:4401-9.
206. Wachino J., Yamane K., Shibayama K., Kurokawa H., Shibata N., Suzuki S., Doi Y., Kimura K., Ike Y., Arakawa Y. (2006b) Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:178-84.
207. Watanabe T. (1963) Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriology Reviews*, 27:87-115.
208. Watkinson A.J., Micalizzi G.R., Bates J.R., and Costanzo S.D. (2007) Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2224–2229.
209. Weese J.S. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J.* 51, 233–244.
210. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M-L., Rasko D.A., et al. (2007) Multiple Antimicrobial Resistance in Plague: An Emerging Public Health Risk. *PLoS ONE* 2(3): e309. doi:10.1371/journal.pone.0000309.
211. Wellinghausen N., Köthe J., Wirths B., Sigge A., Poppert S. (2005) Superiority of Molecular Techniques for Identification of Gram-Negative, Oxidase-Positive Rods, Including Morphologically Nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from Patients with Cystic Fibrosis, *J Clin Microbiol* 43(8):4070-5.
212. White D.G., Alekshun M.N., and McDermott P.F. (ed.). (2005) Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy. *ASM Press, Washington, DC.*
213. Whittington R.J., Chong R. (2007) Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev Vet Med.* 81(1-3):92-116.
214. Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B., and Lübke-Becker A. (2011) Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases

- (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 635–641.
215. Wilke M.H. (2010) Multiresistant bacteria and current therapy—the economical side of the story. *Eur. J. Med. Res.* 15, 571–576.
216. Wing Y.M., Zhanting C., Ho M.L., Anna O.W.L. (2015) Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks, Eco-aquaculture, sustainable development and public health, *Environmental Science and Pollution Research*, pp 1-12.
217. Woodford N. (2008) Successful, multiresistant bacterial clones. *J Antimicrob Chemother.* 61:233-4.
218. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Kimura K., Kai K., Ishikawa S., Ozawa Y., Konda T., Arakawa Y. (2007) 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis.* 13:642-6.
219. Yang H., Chen S., White G.D., Zhao S., McDermott .P, Walker R., Meng J. (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:3483-3489.
220. Yang C., Zhang W., Liu R., Li Q., Li B., Wang S., et al. (2011) Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7408–7415.
221. Ye L., and Zhang T. (2011) Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7173–7179.
222. Ye L., and Zhang T. (2013) Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2681–2690.
223. Yildirim I., Ceyhan M., Gur D. et al. (2007) First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 19: 467–468.

224. Yokoyama K., Doi Y., Yamane K., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Yagi T., Kato H., Arakawa Y. (2003) Acquisition of 16s rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet* 362:1888-93.
225. Yoon J.W., Lee K. J., Lee S.Y., Chae M.J., Park J.K., Yoo J.H., et al. (2010) Antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from Canine patients in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 1764–1768.
226. Zhang Y., Zhou H., Shen X.Q., Shen P., Yu Y.S., Li L.J. (2008) Plasmid-borne *armA* methylase gene, together with *bla*CTX-M-15 and *bla*TEM-1, in a *Klebsiella oxytoca* isolate from China. *J Med Microbiol.*57:1273-6.
227. Zhang T., Zhang X.X., and Ye L. (2011) Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS ONE* 6:e26041.

БИОГРАФИЈА

Ксенија Аксентијевић рођена је 12.07.1978. године у Београду где је завршила основну школу и гимназију. Факултет ветеринарске медицине Универзитет у Београду уписала је 1997. године и завршила га је 29.06.2004. године са просечном оценом 8,72.

Боравила је у Истраживачкој станици Петница 1995 / 1996 године као полазник семинара из Психологије. Усавршавање из уже научне области Физиологија и болести риба обавила је током боравка на Iowa State University, Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, Department of Natural Resource Ecology and Management, The College of Veterinary Medicine, у периоду октобар/новембар 2004. године. Волонтирала је на Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла и Катедри за микробиологију у периоду децембар 2004/мај 2005. године. Усавршавање из уже научне области Имунологија риба обавила је током боравка на National Veterinary Institute, Oslo, Norway, новембра 2006.

Као асистент-приправник на предмету Болести риба, ракова и шкољки ради од 03.10.2005. године. А у звању асистента је од 2010. године. Уписала је последипломске студије на Факултету ветеринарске медицине, смер Ветеринарска превентивна медицина, као и специјалистичке студије из Здравствене заштите риба 2005. године. Магистарску тезу под насловом: „Утицај стреса на квалитативни и квантитативни однос полиморфонуклеара у крви бабушке (*Carassius Gibelio*, Bloch 1782.)“ одбранила је 01.04.2010. године.

- Истраживач је на следећим пројектима:

1. Свеобухватна производња биљних екстраката за високо квалитетне производе са додатом вредношћу - Међународни пројекат ЕУРЕКА!

1. 31011 ТР Утицај квалитета компонената у исхрани ципринида на квалитет меса, губитке и економичност производње. Пројекат финансиран од стране Министарства науке и технолошког развоја Р.Србије

2. 45017 ИИИ Функционални и физиолошки активни биљни материјали са додатом вредношћу за примену у фармацеутској и прехранбеној индустрији. Пројекат финансиран од стране Министарства науке и технолошког развоја Р.Србије

3. 20136 ТР Испитивање бивалентне вакцине против стафилококних и стрептококних инфекција млечне жлезде. Пројекат финансиран од стране Министарства науке и технолошког развоја Р.Србије

4. 143022 ОИ Екофизиолошка и генетичка истраживања домаћих животиња и пчела у функцији повећања репродуктивних својстава и отпорности на болести. Пројекат финансиран од стране Министарства науке и технолошког развоја Р.Србије

До сада је самостално или у сарадњи са другим ауторима публиковала 32 научна и стручна радова, од којих 6 у међународним часописима са СЦИ листе (*Science citation index*). Цитирана је 7 пута у научним радовима других аутора публикованим у међународним часописима. Коаутор је практикума: „Болести риба“ који је намењен студентима интегрисаних основних студија Факултета ветеринарске медицине као и докторима ветеринарске медицине у свакодневном раду.

Говорно и писано знање енглеског језика и познавање рада на рачунару. Поседује возачку дозволу. Удата је и има једну ћерку.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а

мр Ксенија Т. Аксентијевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање резистенције на антибиотике код сојева бактерија изолованих из риба пореклом из различитих средина“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.09 2016.год.

мр Ксенија Аксентијевић
мр Ксенија Т. Аксентијевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Ксенија Т. Аксентијевић

Број уписа

Студијски програм

Наслов рада „Испитивање резистенције на антибиотике код сојева бактерија
изолованих из риба пореклом из различитих средина“

Ментор др Душан Мишић, ванредни професор

Потписана мр Ксенија Т. Аксентијевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног
репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања
доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране
рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05.09. 2016.

Мр Ксенија Аксентијевић
мр Ксенија Т. Аксентијевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање резистенције на антибиотике код сојева бактерија изолованих из риба пореклом из различитих средина“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.09. 2016.


мр Ксенија Т. Аксентијевић