

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Dalibor S. Todorović, DVM

**KARAKTERIZACIJA MEHANIZAMA
REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE I
MOLEKULARNA TIPIZACIJA IZOLATA
ESCHERICHIA COLI POREKLOM OD
GOVEDA I SVINJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Dalibor S. Todorović, DVM

**CHARACTERIZATION OF MECHANISMS
OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND
MOLECULAR TYPING OF *ESCHERICHIA
COLI* ISOLATES ORIGINATING FROM
COWS AND PIGS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 201

MENTORI:

1. Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Katedra za mikrobiologiju

2. Dr Maja Velhner, naučni savetnik

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad" Novi Sad

ČLANOVI KOMISIJE:

3. Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Katedra za biologiju

4. Dr Marina Radojčić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Katedra za mikrobiologiju

5. Dr Edita Grego, naučni saradnik

Institut za javno zdravlje Srbije "Milan Jovanović Batut" Beograd

Datum odbrane:

KRATAK SADRŽAJ

U istraživanju su korišćeni izolati *Escherichia coli* iz mleka krava sa kliničkim mastitisom i od svinja s ciljem njihove molekularne tipizacije, ispitivanja rezistencije na antibiotike, karakterizacije gena za rezistenciju i identifikacije mobilnih genetičkih elemenata. Ispitano je ukupno sedam izolata iz mleka krava i 15 izolata od svinja. Svi izolati su poticali sa različitih farmi koje su se nalazile u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, izuzev jednog izolata *E. coli* od svinje koji je bio iz Mačvanskog upravnog okruga. Metodama elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD), utvrđeno je da izolati *E. coli* nisu genetički srodni. Urađena je filogenetska tipizacija izolata metodom multipleks PCR sa tri prajmera za identifikaciju dva gena i jednog DNK fragmenta *E. coli* koji daju različite PCR produkte tako da se na osnovu njihove kombinacije izolati klasifikuju u četiri filogenetske grupe (A, B1, D i B2). Utvrđeno je da 17 izolata *E. coli* pripada filogenetskoj grupi A, tri izolata pripada grupi B1 i dva grupi D. Rezistencija na tri i više antibiotika je nađena kod svih 22 izolata *E. coli* na osnovu čega se smatra da su izolati multirezistentni. Rezistencija na fluorohinolone koji spadaju u grupu značajnih antibiotika u humanoj medicini, nađena je kod 13 izolata *E. coli*. Kod izolata *E. coli* 1M-13, 2M-13, 3M-13 i 2S-13, nađene su četiri mutacije na genima koji kodiraju topoizomeraze i to na *gyrA* genu nađene su mutacije Ser83→Leu i Asp87→Asn, na genu *parC* identifikovana je mutacija Ser80→Ile, a na *parE* genu Ser458→Ala. Kod izolata 7S-13 nađene su identične mutacije osim na *parE* genu gde je utvrđena supstitucija na Ser448→Thr. Kod četiri izolata *E. coli* 3S-13, 6S-13, 14S-14 i 15S-14, nađene su identične mutacije na *gyrA* i *parC* genima kao kod prethodnih izolata osim što je kod izolata broj 6S-13 na *parC* genu identifikovana izmena aminokiselina Glu84→Lys. Kod izolata 4M-13, 1S-13, 5S-13, 12S-13, gde je MIK na ciprofloksacin bio od 0.5 do 0.125 mg/L, nađena je samo jedna mutacija na *gyrA* genu i to Ser83→Leu, osim kod izolata 5S-13 gde je identifikovana mutacija Asp87→Asn (MIK na CIP 0.062 mg/L). Plazmidom prenosiva rezistencija na hinolone identifikovana je kod jednog izolata *E. coli* iz mleka (3M-13) i kod jednog izolata *E. coli* od svinje (7S-13) kodirana *aac6'Ib-cr* genom, dok je kod jednog izolata *E. coli* od svinje (16S-14) identifikovan *qnrS* gen. Rezistencija na prošireni spektar cefalosporina nađena je kod po jednog izolata *E. coli* iz mleka krave (7M-14) i od svinje (7S-13) i identifikovan je gen *bla_{CTX-M-1}*. Kod najvećeg broja izolata (17 izolata *E. coli*) identifikovani su geni koji kodiraju enzime koji inaktivišu streptomycin, odnosno *strA* i *strB* geni. Rezistencija na ampicilin je kodirana *bla_{TEM-1}* genima kod 16 izolata *E.*

coli, a *tetA* i *tetB* geni su nađeni kod svih 22 izolata rezistentnih na tetraciklin. Geni koji kodiraju integrazu 1 (*int1*) nađeni su kod 14 izolata *E. coli*, a geni koji kodiraju integrazu 2 (*int2*) kod dva izolata *E. coli*. Integroni klase 1 nađeni su kod 12 izolata *E. coli*, a integron klase 2 kod jednog izolata od svinje. Identifikovane su genske kasete koje se nalaze u integronima. Kod dva izolata *E. coli* (4M-13 i 1S-13) nađena je kasete *aadA1*, kod izolata 3S-13, 7S-13, 14S-14 i 15S-14, nađene su genske kasete *drfA17-aadA5*, kod izolata 6M-13, 5S-13, 11S-13 u integronima klase 1 su identifikovane genske kasete *dfrA1-aadA1*. Kod izolata *E. coli* 1M-13 identifikovane su kasete *aadA2-linF*, a samo genska kasete *aadA23* je nađena kod izolata 13S-14. Izolat *E. coli* 16S-14 poseduje i integron 1 i integron 2 gde su nađene sledeće genske kasete *aadA23* na integronu 1 i *aadA1-sat2* na integronu 2. Svi izolati su imali plazmide, ali su konjugabilni plazmidi nađeni kod 16 izolata *E. coli*, odnosno kod 73%. Deset izolata ima multirezistentne konjugabilne plazmide koji kodiraju rezistenciju na tri i više antibiotika.

U zaključku, kod velikog broja izolata nađena je rezistencija na važne klase antibiotika koji se koriste u humanoj medicini. Prekomerna upotreba antibiotika u stočarstvu, u Srbiji, a posebno fluorohinolona je razlog što je izuzetno visoka rezistencija na ciprofloksacin kod izolata *E. coli* od svinja i mleka krava.

Ključne reči: *Escherichia coli*, svinje, mleko krava, mastitisi, PFGE, RAPD, geni za rezistenciju, plazmidi, integroni

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija sa imunologijom

UDK broj: 619:579.62:577.27

SUMMARY

Escherichia coli isolates from milk samples of cows with clinical mastitis and from pigs were used for molecular typing, to determine antimicrobial resistance and to characterize resistance genes and mobile genetic elements. Seven isolates from cow milk and 15 isolates from pigs were included in the study. All of the isolates originated from farms located in the Autonomous Province of Vojvodina except for one isolate which originated from a pig raised in a farm located in the district of Mačva. Applying Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis it was established that all of the isolates were genetically distinguishable. The phylogenetic analysis was done by multiplex PCR method with three primers for identification of two genes and one DNA fragment. This method enables the classification of *E. coli* isolates into four phylogenetic groups (A, B1, D and B2) depending on the amplicon combination obtained. Seventeen *E. coli* isolates belong to phylogenetic group A, three isolates belong to group B1 and two isolates were classified in group D. All of the isolates (Nos 22) were multidrug resistant as resistance was found to ≥ 3 antibiotics. Resistance to fluoroquinolones which are important antibiotics in human medicine was found in 13 isolates. In all of these isolates single or multiple mutation were found in the topoisomerase genes. In isolates 1M-13, 2M-13, 3M-13, 2S-13, four amino acid substitutions were found i.e. Ser83→Leu i Asp87→Asn on *gyrA* gene, Ser80→Ile on *parC* gene and Ser458→Ala on *parE* gene. In isolate 7S-13 identical mutations were found on *gyrA* and *parC* genes but in *parE* gene amino acid substitution Ser448→Thr was found. In isolates 3S-13, 6S-13, 14S-14 and 15S-14, the same amino acid substitutions were found on *gyrA* and *parC* genes as well except for the isolate 6S-13, where on *parC* gene amino acid substitution Glu84→Lys was found. Single point mutation was found on *gyrA* gene in isolates 4M-13, 1S-13, 5S-13, 12S-13 with the minimal inhibitory concentration to ciprofloxacin of 0.5 to 0.125 mg/L. Isolates 4M-13, 1S-13 and 12S-13 had mutation Ser83→Leu, while isolate 5S-13 had mutation Asp87→Asn and MIC to CIP was 0.062 mg/L. Plasmid mediated resistance was identified in one isolate of *E. coli* from cow milk (3M-13) and one isolate from a pig (7S-13) and it was encoded by *aac6'Ib-cr* gene while in one isolate from a pig (16S-14) the *qnrS* gene was identified. The *bla*_{CTX-M-1} gene conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins was found in one isolate from cow milk (7M-14) and one isolate from a pig (7S-13). The *strA* and *strB* pair of genes, encoding streptomycin inactivating enzymes were found in 17 isolates. The *bla*_{TEM-1} gene was found to confer resistance

to ampicillin in 16 *E. coli* isolates, while *tetA* and *tetB* genes were found in all isolates resistant to tetracycline (22 isolates). Genes encoding integrase 1 (*int1*) were found in 14 *E. Coli* isolates, while genes encoding integrase 2 (*int2*) were found in two *E. coli* isolates. Integrons class 1 was detected in 12 *E. Coli* isolates and integron class 2 in one isolate from a pig. Gene cassette in integrons was analyzed. The cassette *aadA1* was found in two *E. coli* isolates (4M-13, 1S-13), while the *drfA17-aadA5* gene cassette array was found in isolates 3S-13, 7S-13, 14S-14 and 15S-14. Another cassette array *dfrA1-aadA1* was identified in isolates number 6M-13, 5S-13, 11S-13. In *E. coli* isolate 1M-13 a gene cassette array *aadA2-linF* was found in integron 1 element, while single cassette *aadA23* was found in isolate 13S-14. The *E. coli* isolate 16S-14 both integron 1 and integron 2 were identified. In integron 1 gene cassette *aadA23* was found, while in integron 2 a gene cassette array *aadA1-sat2* was detected. Conjugative plasmids were identified in 16 isolates (73%) among which multidrug resistant conjugative plasmid (resistance to ≥ 3 antibiotics) was found in ten isolates.

In conclusion, numerous *E.coli* isolates confer resistances to antibiotics which are used in human medicine. The high resistance to ciprofloxacin in *E. coli* isolates from cow milk and pigs can be explained by the overuse of antibiotics, especially fluoroquinolones, in livestock industry in Serbia.

Key words: *Escherichia coli*, pigs, cow milk, PFGE, RAPD, resistance genes, plasmids, integrons

Scientific area: Veterinary medicine

Scientific field: Microbiology and Immunology

UDK number: 619:579.62:577.27

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Morfologija, fenotipske osobine i identifikacija <i>E. coli</i>	4
2.2. <i>E. coli</i> kao oportunistički patogen	5
2.3. Genetika bakterija	8
2.4. Antibiotici i rezistencija bakterija	9
2.5. Transfer gena i mobilni genetički elementi	11
2.6. Mehanizmi rezistencije bakterija	14
2.6.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike	15
2.6.2. Rezistencija na hinolone i fluorohinolone	17
2.6.3. Rezistencija na hloramfenikol i florfenikol	20
2.6.4. Rezistencija na aminoglikozide	22
2.6.5. Rezistencija na sulfonamide	23
2.6.6. Rezistencija na trimetoprim	24
2.6.7. Rezistencija na tetracikline	24
2.7. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u svetu	26
2.8. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u državama Evropske unije	27
2.9. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u Srbiji i državama okruženja	30
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	32
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Materijal	33
4.2. Metode	34
4.2.1. Izolacija i identifikacija <i>E. coli</i>	34
4.2.2. Ispitivanje osetljivosti izolata <i>E. coli</i> na antibiotike disk difuzionom metodom na agaru.....	35
4.2.3. Ispitivanje osetljivosti izolata <i>E. coli</i> na antibiotike mikrodilucionom metodom u bujonu	36
4.2.4. Detekcija gena rezistencije izolata <i>E. coli</i> metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)	39

4.2.5. Određivanje filogenetske pripadnosti izolata <i>E. coli</i> metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)	45
4.2.6. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata <i>E. coli</i> metodom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD)	45
4.2.7. Utvrđivanje genetičkog sastava integrona metodom sekvenciranja	46
4.2.8. Eksperiment konjugacije	46
5. REZULTATI	50
5.1. Utvrđivanje multirezistencije izolata <i>E. coli</i> primenom disk difuzione metode na agaru	50
5.2. Utvrđivanje multirezistencije izolata <i>E. coli</i> primenom mikrodilucione metode u bujonu	53
5.3. Utvrđivanje filogenetske pripadnosti multirezistentnih izolata <i>E. coli</i> metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)	54
5.4. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata <i>E. coli</i> metodom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD)	55
5.5. Utvrđivanje prisustva gena <i>E. coli</i> koji kodiraju rezistenciju na određene klase antibiotika metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)	58
5.6. Utvrđivanje prenosa plazmida eksperimentom konjugacije	65
6. DISKUSIJA	71
6.1. Molekularna tipizacija izolata <i>E. coli</i>	72
6.2. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike	74
6.3. Rezistencija na hinolone i fluorohinolone	76
6.4. Rezistencija na aminoglikozide	78
6.5. Rezistencija na hloramfenikol i florfenikol	79
6.6. Rezistencija na sulfonamide	79
6.7. Rezistencija na trimetoprim	80
6.8. Rezistencija na tetracikline	81
6.9. Konjugabilni plazmidi	82
6.10. Integroni	83
7. ZAKLJUČAK	86

8. SPISAK LITERATURE	89
9. PRILOG 1	101
10. PRILOG 2	103

1. UVOD

Jedan od najvažnijih zadataka humane i veterinarske medicine je očuvanje efikasnosti antibiotika kod lečenja infekcija ljudi i životinja. Prekomerna, nestručna i nesvrshodna primena antibiotika i hemioterapeutika dovela je do masovne pojave rezistencije bakterija na antibiotike praćene neefikasnom terapijom, težom kliničkom slikom i povećanjem smrtnosti obolelih jedinki. Brojna naučna istraživanja ukazuju na kontinuirano pojavljivanje i proširivanje rezistencije kod bakterija, što opravdava strahovanja o povratku čovečanstva u doba preantibiotske ere i pojavi fatalnih infektivnih oboljenja bez mogućnosti efikasne antimikrobne terapije. Pojava multirezistentnih mikroorganizama kod životinja ima značajne implikacije po zdravlje ljudi, usled rizika od direktnog ili indirektnog prenošenja rezistentnih patogenih bakterija od životinja na ljude, kao i od horizontalnog transfera gena rezistencije od bakterija poreklom od životinja u bakterije patogene za ljude.

Najvažniji načini prenošenja rezistentnih bakterija na ljude su direktan kontakt sa životinjama i konzumiranje kontaminiranih namirnica. Pojava rezistencije bakterija na antibiotike, njihovo perzistiranje i prenošenje u prirodi, smatra se jednim od najvećih problema savremene medicine. Zahvaljujući svojim mehanizmima rezistencije, multirezistentne bakterije uspevaju da zadrže svoje fenotipske i genotipske osobine koje uslovljavaju rezistenciju kroz duži vremenski period i u odsustvu antibiotika (Richardson, 2017). Samim tim rezistentne bakterije koje se održavaju i šire sa i bez prisustva antibiotika, imaju značajnu prednost u odnosu na bakterije koje su osetljive na antibiotike.

Smatra se da smanjenje upotrebe antibiotika u stočarskoj industriji ima direktne efekte na smanjenje rezistencije kod bakterija u humanoj medicini. Međutim, ima dosta primera koji ne podržavaju navedenu teoriju. Na primer, u Evropi je rezistencija *Enterococcus* spp. na vankomicin nastala zahvaljujući primeni promotora rasta avoparcina u stočarstvu. Zabranom korišćenja avoparcina u stočarstvu smanjena je pojava vankomicin rezistentnih *Enterococcus* spp. kod životinja, ali nažalost kod ljudi nije došlo do značajnog smanjenja rezistencije što je posledica primene navedenog antibiotika u humanoj kliničkoj praksi (Chang i sar., 2015). Rezistencija na fluorohinolone kod *Salmonella* spp. koje potiču od životinja dokazana je i kod izolata *Salmonella* spp. koje potiču od ljudi, ali smanjenje primene enrofloksacina u stočarstvu ne utiče bezuslovno na smanjenje rezistencije na fluorohinolone kod izolata salmonela u

humanoj populaciji. Zahvaljujući putovanjima ljudi u zemlje u kojima je rezistencija na antibiotike veoma raširena, kao i zahvaljujući trgovini, rezistentne bakterije mogu da se prenesu interkontinentalno i da se godinama održe u zajednicama (Chang i sar., 2015). Prema tome rezistencija na antibiotike teško može da se eliminiše kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini. Međutim, ukoliko se kroz duži vremenski period smanji upotreba antibiotika ili ukine primena nekih antibiotika u stočarstvu, smanjuje se rizik od pojave rezistenih mikroorganizama.

Antibiotici treba da se koriste pažljivo i samo ukoliko je neophodno, posebno zbog toga što bakterije mogu da razviju rezistenciju na praktično sve klase antibiotika, bilo da se radi o prirodnim supstancama, polusintetičkim ili sintetičkim preparatima. Poseban problem je primena antibiotika istog hemijskog sastava i istog mehanizma delovanja u veterinarskoj medicini i humanoj medicini. Rezistencija na fluorohinolone, cefalosporine proširenog spektra delovanja i aminoglikozide kod Gram negativnih bakterija u značajnoj meri može da oteža terapiju kod ljudi, odnosno uslovi neophodnost primene najsavremenijih antibiotika na koje bakterije takođe posledično mogu da razviju rezistenciju.

Najvažniji mobilni genetički elementi kod bakterija su plazmidi, transpozoni i genske kasete. Bakterije su razvile sposobnost da ugrade, uklone i/ili podele gene za rezistenciju zavisno od sopstvenih potreba i zavisno od okruženja (Richardson, 2017). Samim tim je identifikacija multirezistentnih bakterija i determinacija mobilnih genetičkih elemenata od velikog značaja zato što ukazuje na rizike od pojave rezistencije na važne klase antibiotika i ukazuje na mogućnost prenošenja rezistencije na druge mikroorganizme. Integroni su specifični genetički mehanizmi kod bakterija koji im omogućavaju da ugrade jednu ili više genskih kasete koje kodiraju rezistenciju na antibiotike, dezinficijense ili teške metale i koji omogućavaju ekspresiju gena za rezistenciju. Shodno tome geni za rezistenciju na antibiotike su često prisutni na integronima zajedno sa genima za rezistenciju na teške metale i dezinficijense, što favorizuje širenje rezistencije u prirodi, čak i na antibiotike i druge agense koji se više ne koriste ili se nikada nisu koristili u nekim delovima sveta. Konjugabilni plazmidi mogu da poseduju ne samo gene za rezistenciju nego i gene koji kodiraju faktore virulencije tako da obezbeđuju preživljavanje bakterija u nepovoljnim uslovima. Transpozoni su takođe mobilni genetički elementi i mogu da se prenose duž DNK lanca istog ili različitih vrsta mikroorganizma, što je omogućeno zahvaljujući insercionim sekvencama koje su umetnute na početku i na kraju DNK transpozona.

Takođe ima puno dokaza o razmeni genetičkog materijala između raznih vrsta bakterija. Odličan primer predstavlja *Salmonella enterica* serovar Kentucky kod pilića, koja je od ekstraintestinalne patogene *Escherichia coli* (APEC) preuzela ColV plazmid sa genima koji kodiraju brojne bakteriocine uključujući i kolicin V, što je pored značajne kompeticije sa invaznim salmonelama poput *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* omogućilo opstanak *S. Kentucky* na farmama živine (Johnson i sar., 2010).

Istraživanja iz oblasti antimikrobne rezistencije značajno doprinose razumevanju nastanka rezistencije kao i njenog prenošenja. U novije vreme ova istraživanja poprimaju multidisciplinarni karakter uvođenjem tehnika celokupnog sekvenciranja genoma, analize rizika i drugih matematičkih modela. Determinacija gena rezistencije i mobilnih genetičkih elemenata je veoma važan korak u identifikaciji rezistentih bakterija, a indikatorski mikroorganizam *E. coli* služi kao važan pokazatelj rezistencije u životnoj sredini (Levy i Marshal, 2004). Perzistiranje multirezistentih bakterija poput *E. coli* u primarnoj proizvodnji je veliki problem. Zahvaljujući tome što se životinje na farmama gaje na malom prostoru, mikroorganizmi mogu da se prenose putem hrane, opreme, vozila, vazduha i ljudi na veliki broj životinja u zapatu. Kontinuirano praćenje i ispitivanje rezistencije na antibiotike komensalne *E. coli* pomaže kod utvrđivanja empirijske terapije do momenta kada je dostupan antibiogram.

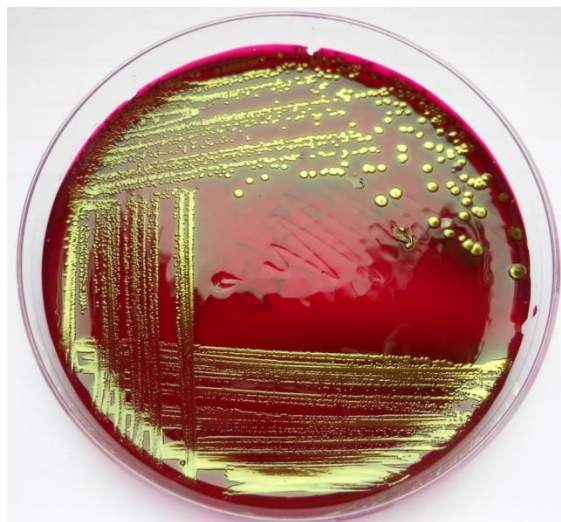
Iz navedenih razloga u epidemiološkim istraživanjima se koristi rezistotipizacija, molekularna tipizacija i determinacija gena za rezistenciju, što omogućava otkrivanje izvora infekcije/kontaminacije, a takođe omogućava da se genetičkim metodama analiziraju izolati rezistentnih bakterija prilikom izbijanja epidemija („outbreak isolates“) ili prilikom utvrđivanja zdravstvene bezbednosti hrane u lancu proizvodnje „od farme do trpeze“.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Morfologija, fenotipske osobine i identifikacija *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je Gram negativna bakterija koja pripada familiji *Enterobacteriaceae*. Štapićastog je oblika i veličine 1,1-1,5 x 2-3 μm . Pokretna je zahvaljujući peritrihnim flagelama. Pripada aerobima i fakultativnim anaerobima. Nema sposobnost da stvara spore, ali poseduje kapsulu (Quinn i sar., 2011).

Nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C dobro raste na krvnom agaru (sive kolonije) sa ili bez hemolize, McConkey agaru (ružičaste kolonije) i ksiloza dekstroznom agaru (žute kolonije). Na endo agaru kolonije su fluorescentno-zelene sa metalnim sjajem (Slika 1). Oksidaza test je negativan, dok je katalaza test pozitivan. *E. coli* razgrađuje glukozu i laktozu, i ima sposobnost produkcije sumporvodonika (H_2S), što se može ustanoviti zasejavanjem na trostruki Kliglerov šećer. Odlikuje se pozitivnom indol i metil crvenom reakcijom, dok su urea i citrat negativni (Quinn i sar., 2011).



Slika 1. Izgled kolonija *E. coli* na endo agaru, nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C

Pored standardnih biohemijskih reakcija, danas se za identifikaciju *E. coli* koriste i VITEK analizator i MALDI-TOF masena spektrometrija. Brza i tačna identifikacija bakterija je od suštinskog značaja u dijagnostici, pa se danas sve više koristi metoda lančane reakcije polimeraze (PCR). PCR metodom se detektuju *gadA/B* geni, visoko specifičani za *E.coli*, koji kodiraju enzim glutamat dekarboksilazu (GAD) (McDaniels i sar., 1996). Oba gena su visoko

srodna, nalaze se na različitim lokacijama na hromozomu i učestvuju u metabolizmu *E. coli*. Ovi geni su nađeni kod velikog broja raznorodnih izolata *E. coli*, što ukazuje na činjenicu da su visoko konzervirani (Smith i sar., 1992).

Sojevi *E. coli* se dele na serološke grupe na osnovu somatskog (O) antigena, a na osnovu kapsularanog (K), flagelarnog (H) i fimbrijalnog (F) antigena na serovarijetete (Habrun, 2014). Serološka tipizacija *E. coli* godinama se koristi kako kod epidemioloških istraživanja tako i kod proizvodnje vakcina od autohtonih izolata *E. coli* od životinja. Međutim, u istraživanjima u kojima je ispitan veliki broj izolata (od više stotina do preko hiljadu), četvrtina izolata obično ne može da se tipizira ili spada u retku serološku grupu (Johnson i sar., 2009). Veoma često izolati koji su identifikovani kao patogeni pripadaju istim serološkim grupama kao i nepatogeni izolati, ili su to autoaglutinabilne *E. coli* (Rodriguez-Siek i sar., 2005).

2.2. *E. coli* kao oportunistički patogen

E. coli je komensal digestivnog trakta ljudi i većine životinjskih vrsta koji se kontinuirano izbacuje u spoljašnju sredinu. Kolonizacija digestivnog trakta počinje ubrzo nakon rođenja i predstavlja sastavni deo mikrobiota creva tokom života (Clermont i sar., 2011). U crevima *E. coli* sa 10^6 do 10^8 uzročnika u jednom mililitru fecesa predstavlja najzastupljeniju fakultativno anaerobnu bakteriju (Ašanin i sar., 2006). Osim što ima korisne uloge u organizmu životinja i ljudi, *E. coli* je oportunistički patogen koji može da izazove ozbiljne intestinalne i ekstraintestinalne infekcije (Clermont i sar., 2011). Faktori virulencije patogene *E. coli* su somatski (O), kapsularni (K), flagelarni (H), fimbrijalni (F) antigeni, zatim, α i β hemolizini, enterotoksini (termolabilni i termostabilni) i endotoksini (lipid A) (Habrun, 2014). Kod ljudi *E. coli* primarno izaziva infekcije urinarnog trakta, a kod životinja kolibacilozu. Pored dijareje, šiga-toksin produkujući sojevi patogene *E. coli* mogu dovesti do ozbiljnih sistemskih oboljenja kao što su hemolitičko-uremični sindrom ljudi i edemska bolest svinja (Cullor i Smith, 1996).

Za određivanje filogenetske pripadnosti *E. coli* može da se koristi molekularna tipizacija koja se zasniva na identifikaciji gena *chuA*, *yjaA* i *TspE*. Ovi geni su visoko konzervirani i poseduju ih sve vrste *E. coli* (Clermont i sar., 2011). Kod životinja koje se gaje za proizvodnju hrane za ljude, određeni faktori virulencije mogu da se detektuju i kod izolata iz grupe komensala. Uglavnom patogene *E. coli* spadaju u B₂ grupu po Clermontu, međutim postoje i

odstupanja. Za identifikaciju avijarne patogene *E. coli* (APEC) koristi se molekularna tipizacija gena virulencije *iroN*, *iutA*, *hlyF*, *ompT* i *iss* (Johnson i sar., 2008).

Ekstraintestinalna *E. coli* uzrokuje razna oboljenja živine: salpingitis, koli-granulomatozu, upalu vazdušnih kesica, akutni vaginitis kod ćuraka, omfalitis i drugo. Najveće probleme u živinarstvu u celom svetu uzrokuje avijarna patogene *E. coli* (APEC) koja izaziva koli-sepsu. Najčešći predisponirajući faktor koji utiče na pojavu koli-sepse je stres izazvan virusnim infekcijama ili nepovoljnim uslovima držanja živine poput naseljavanja velikog broja ptica u objektima za uzgoj ili stres usled visokih temperatura leti. Avijarna patogene *E. coli* se nalazi u digestivnom traktu i zdrave živine i zbog toga je teško eliminisati ove bakterije sa farmi (Saif i sar., 2008). Postojanje mnogobrojnih faktora virulencije (sistema za transport gvožđa, eliminacije prirodnih imunskih pepetida, sistema za formiranje vezikula koje izbacuju faktore virulencije izvan bakterijske ćelije, hemolizina) kao i posebnih mehanizama invazivnosti koji omogućavaju da APEC prođe kroz zid creva i pređe u parenhimatozne organe, gde izaziva patološke promene, APEC je uglavnom rezistentna na više antibiotika, što otežava terapiju (Johnson i sar., 2008). Zbog značaja patogene *E. coli* u živinarstvu, u razvijenim zemljama se sprovodi vakcinacija protiv ovog oboljenja. I pored toga, smatra se da je primena dobrog menadžmenta na farmama jedan od najvažnijih načina da se smanje zdravstveni problemi u živinarstvu izazvani sa APEC i da se smanje ekonomski gubici farmera (Saif i sar., 2008).

E. coli je najčešći uzročnik infekcija urinarnog (pijelonefritis i cistitis) i gastrointestinalnog trakta pasa i mačaka (gastroenteritis i granulomatozni kolitis) (Marks i sar., 2011). Kolonizacija urinarnog trakta bakterijom *E. coli* zavisi od ekspresije fimbrijalnih adhezivnih proteina koji olakšavaju vezivanje bakterija za epitel, kao i prisustvo specifičnih bakterijskih gena koji kodiraju faktore virulencije (Momtaz i sar., 2013). Terapija urinarnih infekcija pasa beta-laktamima, aminoglikozidima, sulfonamidima i cefalosporinima je efikasna međutim, veliki problem predstavljaju sojevi rezistentni na skoro sve klase antibiotika (Yousefi i Torkan, 2017).

Infekcija mlečne žlezde krava izazvana oportunističkom *E. coli* je veoma slična *E. coli* infekciji urinarnog trakta jer najpre kolonizuje sisni kanal odakle se ascedentno širi prema parenhimu mlečne žlezde. *E. coli* je u odnosu na ostale koliformne bakterije najčešći uzročnik kliničkog mastitisa (80% slučajeva), koji ima karakter brzog nastajanja sa ozbiljnim kliničkim

znacima. Patogeneza koliformnog mastitisa je potpuno drugačija od patogeneze kolibaciloze teladi i svinja. Dok je patogenezna enterotoksične *E. coli* vezana za nekoliko specifičnih površinskih proteina koji prepoznaju specifične receptore na epitelnim ćelijama mukoze creva, patogenezna zapaljenja vimena indukovana je endotoksinom (lipopolisaharid) iz ćelijskog zida *E. coli* (Suojala i sar., 2013). Endotoksin je primarni faktor virulencije koji započinje pokretanje patofiziološke reakcije u vimenu. Glavni problem je brzo umnožavanje *E. coli* u akutnoj fazi infekcije, pre nego što neutrofili iz cirkulacije pređu u parenhimatozni deo vimena. Kada neutrofili fagocituju bakterije u parenhimu, oslobađaju se medijatori zapaljenja. Endotoksin ćelijskog zida *E. coli* zajedno sa medijatorima zapaljenja dovodi do patoloških promena parenhima mlečne žlezde i kliničke manifestacije mastitisa. Serotipovi *E. coli* koji izazivaju mastitise krava slični su serotipovima izolovanim iz fecesa krava (Burvenich i sar., 2003).

Kontrola mastitisa izazvanih bakterijom *E. coli* treba da se oslanja na preventivu, a ne na terapiju koja najčešće počinje tek kada se uoče klinički simptomi na vimenu. Tada se već uveliko *E. coli* izlučuje mlekom, a oštećenja koja su nastala u parenhimu mlečne žlezde se ne mogu zaustaviti. Veliki broj sojeva *E. coli* je rezistentan na ampicilin, streptomycin i sulfonamide, tako da je terapija ovim antibioticima po pravilu neuspešna. Ukoliko je nastao perakutni ili teži oblik koli-mastitisa, terapija je sistemska, kako bi se spasila krava (Lago i sar., 2011). Koriste se antibiotici širokog spektra delovanja, trimetoprim-sulfametoksazol, oksitetraciklin, fluorohinoloni, ceftiofur i cefkvinom. Metalni joni poput kalcijuma znaju da ometaju dejstvo fluorohinolona u mlečnoj žlezdi, a nakon baktericidnog delovanja oslobađa se velika količina lipopolisaharidnog endotoksina koji predstavlja potencijalni rizik po zdravlje ljudi, tako da se fluorohinoloni ne preporučuju za terapiju mastitisa (Suojala i sar., 2013).

Enterotoksična *E. coli* je jedan od glavnih uzroka uginuća neonatalne i odlučene prasadi. Adhezini i enterotoksini su glavni faktori virulencije koji izazivaju infekciju (Francis, 1999). Fimbrijalni adhezini K88, K99, 987P, F41, i F18 se vezuju za specifične receptore na epitelu mukoze creva i omogućavaju *E. coli* da kolonizuje površinu enterocita i izluči enterotoksine čime će izazvati dijareju životinje. Enterotoksini *E. coli* koji dovode do nastanka dijareje su: termolabilni enterotoksin, termostabilni enterotoksin tip A, termostabilni enterotoksin tip B, šiga toksin tip 2e i enteroagregativni termostabilni toksin 1. Šiga toksin tip 2e kada se apsorbuje u krv uništava endotelne ćelije u manjim krvnim sudovima dovodeći do stvaranja krvnih ugrušaka,

hemoragije, ishemije i nekroze u vitalnim organima što može dovesti do uginuća životinje (Francis, 2002).

Kako kod kolibaciloze svinja životinje ne uzimaju ni hranu ni vodu, kod lečenja se primenjuje parenteralna antimikrobna terapija. U mnogim zemljama EU, terapija kolibaciloze svinja sprovodi se upotrebom antibiotika svrstanih u tri nivoa. Antibiotici prvog nivoa (beta-laktamski antibiotici, streptomycin, tetraciklin) primenjuju se kao kauzalna terapija, kada se na osnovu kliničkih znakova dijagnostikuje kolibaciloza. Antibiotici drugog nivoa (gentamicin, neomicin, sulfonamidi u kombinaciji sa trimetoprimom) primenjuju se onda kada je *E. coli* postala rezistentna na antibiotike prvog nivoa. Antibiotici trećeg nivoa (treća i četvrta generacija cefalosporina, fluorohinoloni i makrolidi) su rezervisani za terapiju poslednjeg izbora. Kolibaciloza izazvana sojevima *E. coli* rezistentim na antibiotike poslednjeg izbora, a najčešće na fluorohinolone, predstavlja veliki problema za uspešnu terapiju (Luppi, 2017).

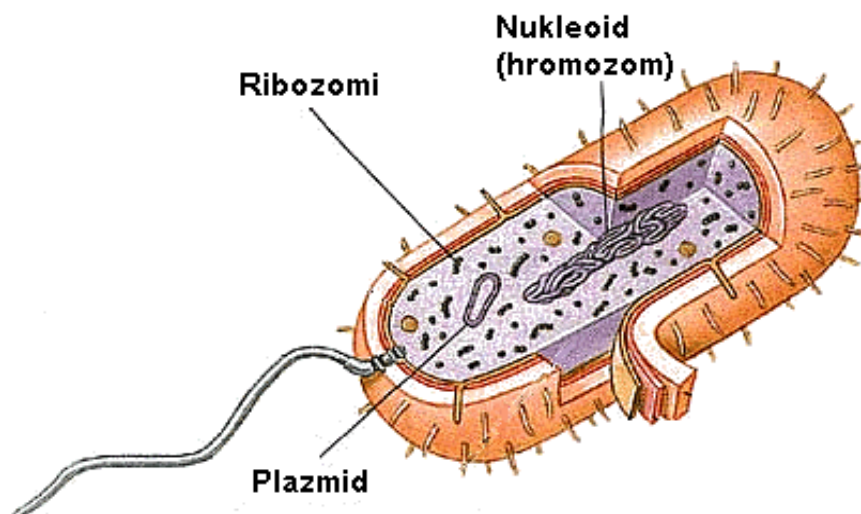
Imajući u vidu da pojedini sojevi *E. coli*, koji su prisutni u crevima, mogu da uzrokuju oportunističke infekcije, kao i da postoje striktno patogeni sojevi koji izazivaju određena oboljenja životinja i ljudi, utvrđivanje pojave i raširenosti rezistencije je od velikog značaja kod izbora efikasne antimikrobne terapije. Pored toga izolati *E. coli* od zdravih životinja predstavljaju idealni indikatorski mikroorganizam za praćenje antimikrobne rezistencije.

2.3. Genetika bakterija

Genetički materijal bakterija nije odvojen membranom od citoplazme kao jedro eukariota, već je smešten u centralnom delu koji se zove nukleoid (slika 2). Genom bakterijske ćelije je cirkularni hromozom sa dvostrukim lancem dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), mada postoje bakterije koje imaju i dva hromozoma (bakterije roda *Brucella*). Sve vitalne funkcije i osobine bakterijske ćelije, kao što su patogenost, virulencija i rezistencija na antibiotike, kodirane su genima koji se nalaze na hromozomu (Habrun, 2014).

Pored hromozoma, kao glavnog genetičkog materijala, u bakterijskoj ćeliji može postojati jedan ili više plazmida (Slika 2). Plazmidi se replikuju nezavisno od bakterijskog hromozoma iako za replikaciju koriste mehanizme ćelije domaćina. Bakterijska ćelija može imati jedan ili više plazmida, na kojima se nalaze geni za virulenciju, geni koji kodiraju rezistenciju na

antibiotike, ali i rezistenciju na brojne toksične metale poput žive, kadmijuma i srebra (Bennett, 2008).



Slika 2. Genom bakterijske ćelije

Bakterije tokom svog života mogu da koriste i genetski materijal bakteriofaga (virusi koji inficiraju bakterije) (Bennett, 1999). Bakteriofagi se sastoje samo od proteinskog omotača koji okružuje genom virusa, a ovi obligatni intracelularni paraziti nisu u stanju da se umnožavaju u odsustvu svog bakterijskog domaćina. U nekim slučajevima oni mogu biti u stanju kontrolisane replikacije (lizogenija) unutar bakterijske ćelije. U takvim situacijama genom bakteriofaga postaje privremeni deo ukupnog genetskog materijala koji stoji na raspolaganju bakterijskoj ćeliji (Erski-Biljić i Dobrić, 1998; Bennett, 1999).

2.4. Antibiotici i rezistencija bakterija

Antibiotici su supstance koje svojim baktericidnim delovanjem ubijaju bakterije, dok bakteriostatskim delovanjem zaustavljaju rast i razmnožavanje bakterija, a da pri tome ne nanose štetu domaćinu. Prirodne antibiotike stvaraju bakterije i gljivice u prirodnim uslovima. Polusintetski antibiotici nastaju kada se prirodni antibiotici hemijskim procedurama promene, radi poboljšanja nekih njihovih osobina. Sintetski antibiotici nastaju hemijskim putem i zato se zovu hemioterapeutici (Jezdimirović, 2005). Prvi hemijski sintetisani antibiotici bili su sulfonamidi proizvedeni i primenjeni 1935. godine. Iako je na postojanje prirodnih antibiotika

ukazao još 1928. godine Aleksandar Flemming, proizvodnja i terapijska upotreba prvog antibiotika penicilina započela je tokom Drugog svetskog rata (Habrun, 2014).

Prema mehanizmu delovanja antibiotici se dele na četiri grupe (Jezdimirović, 2005):

1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterija
2. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina bakterija
3. Antibiotici koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina bakterija
4. Antibiotici koji dovode do promene permeabilnosti membrane bakterijske ćelije

Da bi se suprotstavile dejstvu antibiotika bakterije koriste različite mehanizme rezistencije. Neke bakterije su prirodno otporne na pojedine antibiotike (na primer, mikoplazme na beta-laktamske antibiotike jer nemaju ćelijski zid), dok stečena otpornost nastaje promenom genetičkog materijala bakterije (Habrun, 2014). Nakon aplikacije antibiotika, komensalna flora biva potisnuta selekcijskim pritiskom, dok rezistentna ostaje i dalje se razmnožava. Dugotrajna upotreba jednog antibiotika (više od 10 dana), selektuje ne samo bakterije rezistentne na taj antibiotik već i na druge. Organizam postaje fabrika rezistentnih bakterija koje se brzo pojave u okruženju nakon primene antibiotika, ali se veoma sporo gube (Levy i Marshal, 2004).

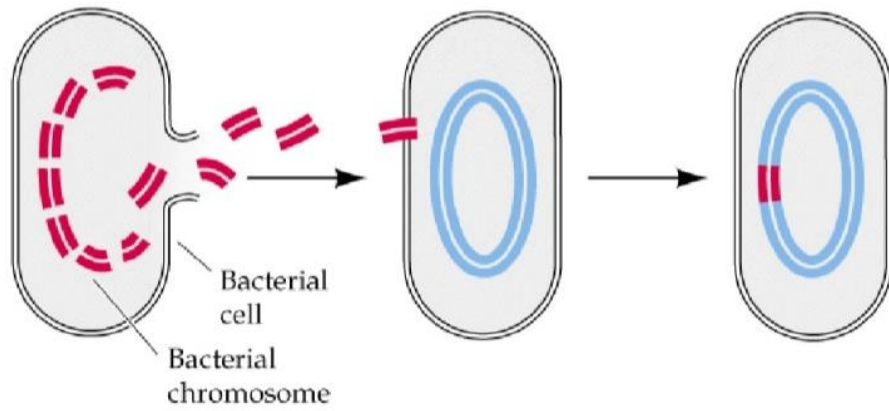
Intenzivan uzgoj životinja na farmama zahteva primenu brojnih antibiotika u lečenju različitih bakterijskih infekcija. Često antimikrobni tretman počinje bez prethodnog ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike, što može da dovede do pojave rezistencije kod određenih sojeva bakterija. Široka upotreba antibiotika uzrokovala je da bakterije koriste specifične mehanizme rezistencije kako bi preživele u okruženju (Hendriksen i sar., 2008). Pored rezistencije kod patogenih bakterija, prekomerna upotreba antibiotika dovodi do stvaranja rezervoara gena za rezistenciju kod komensala (Schierack i sar., 2009). Hrana proizvedena od ovakvih životinja je glavni rezervoar gena za rezistenciju kod ljudi. Prenos rezistentnih sojeva bakterija putem hrane između životinja i ljudi predstavlja veliku opasnost po javno zdravlje (Thorsteinsdottir i sar., 2008). Smatra se da je lanac proizvodnje hrane glavni izvor patogenih ili nepatogenih rezistentnih bakterija koje preko mobilnih genetičkih elemenata prenose gene za rezistenciju i virulenciju između i unutar vrsta, što može dovesti do njihovog interkontinentalnog širenja.

Veliki problem u humanoj i veterinarskoj medicini predstavlja rezistencija bakterija na najnovije klase antibiotika. Stoga se ispitivanje rezistencije kod određenih vrsta bakterija sprovodi u celom svetu u sastavu monitoringa koji je obavezan (Hendriksen i sar., 2008). Od posebnog interesa je izučavanje mehanizama rezistencije kod multirezistentnih bakterija, upravo zbog toga što poseduju mobilne genetičke elemente kojima mogu da prenose gene za rezistenciju na srodne i nesrodne vrste bakterija (Gillings i sar., 2008; Velhner i sar., 2010).

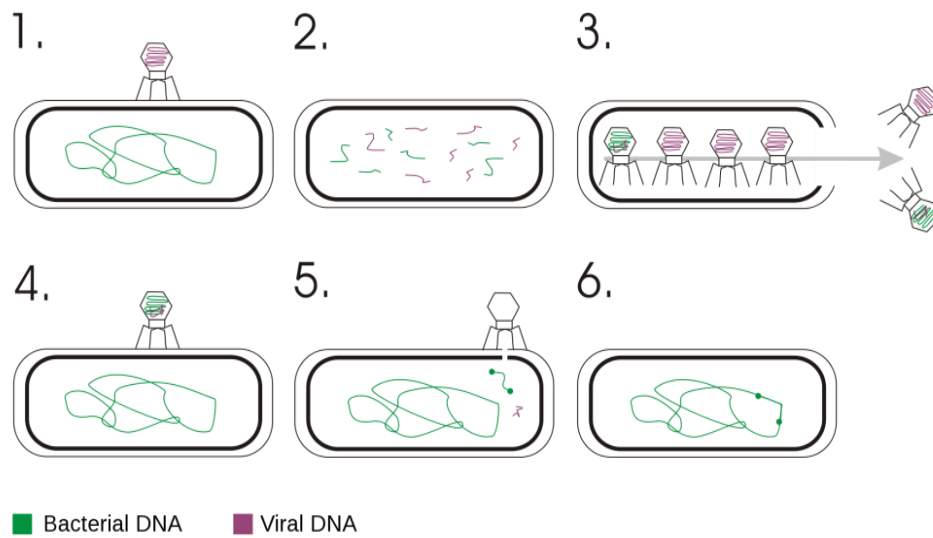
Kada se ispituje osetljivost bakterija na antibiotike koriste se dokumenti Kliničkog instituta za laboratorijske standarde (CLSI) ili Evropskog komiteta za testiranje osetljivosti na antibiotike (EUCAST). U CLSI dokumentu date su vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (MIK) za izolate bakterija koje se klasifikuju kao osetljivi, intermedijarni i rezistentni. Pema tome, MIK može da posluži za studije ispitivanja kliničke efikasnosti leka, evaluaciju doze i načina aplikacije, kao i za utvrđivanje parametara farmakodinamike i farmakokinetike. Za izveštavanje osetljivosti na antibiotike patogenih bakterija (*Salmonella*, *Camyplobacter* i *Staphylococcus aureus*) ili indikatorskih mikroorganizama (*E. coli* i *Enterococcus*), koristi se epidemiološka granična vrednost (ECOF) za interpretaciju rezultata MIK analize, a bakterije se svrstavaju u „wild type“ ili „non wild type“ (mikrobiološka rezistencija). U izveštajima Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) osetljivost bakterija na antibiotike interpretira se preko epidemioloških graničnih vrednosti (Schwarz i sar., 2010).

2.5. Transfer gena i mobilni genetički elementi

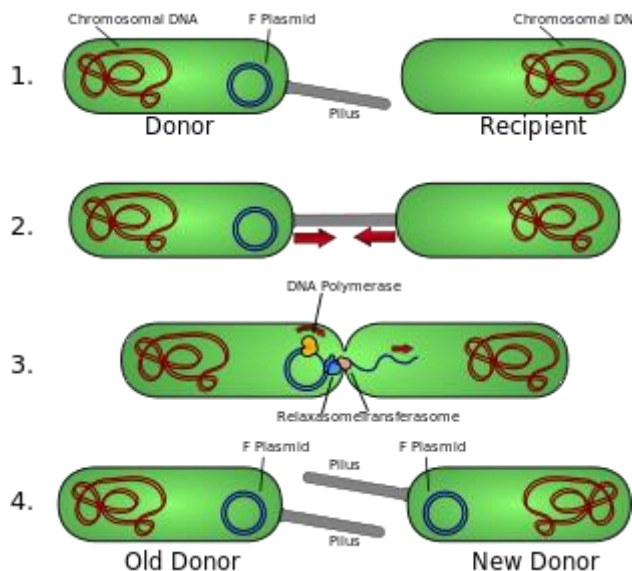
Postoje tri mehanizma preko kojih se obavlja horizontalni transfer genetičkog materijala: transformacija, transdukcija i konjugacija (Bennett, 1999). Tokom procesa transformacije (Slika 3), ogoljena DNK iz životne sredine se ugrađuje u hromozom preko specifičnih sekvenci za prepoznavanje. Transdukcijom (Slika 4) se genetički materijal prenosi u drugu bakterijsku ćeliju preko bakteriofaga. Kod procesa konjugacije (Slika 5) dve bakterijske ćelije se spoje i razmene plazmide. Razmena genetičkog materijala se odigrava preko konjugabilnih plazmida koji su u sastavu ćelije kao slobodni elementi ili su ugrađeni u hromozom. Razmena genetičkog materijala se može obaviti i preko konjugabilnih transpozona koji poseduju insercione sekvence koje omogućavaju njihovu ugradnju ili isecanje i premeštanje unutar hromozoma istih ili različitih bakterijskih ćelija (Bennett, 2008).



Slika 3. Prikaz mehanizma transformacije



Slika 4. Prikaz mehanizma transdukcije pomoću bakteriofaga



Slika 5. Prikaz mehanizma konjugacije između donora i recipijenta

Prenos DNK sekvenci sa jedne bakterijske ćelije na drugu, sa jednog DNK molekula na drugi, sa jednog plazmida na drugi, ili sa plazmida na hromozom, odvija se pomoću specifičnih sekvenci koje omogućavaju ugradnju ili isecanje mobilnih genetičkih elemenata bakterije. (Bennett, 1999). Mobilni genetički elementi su: transpozoni, genske kasete i integroni.

Transpozoni su očigledan primer mobilnih genetičkih elemenata čija je mobilnost omogućena zahvaljujući insercionim sekvencama. Insercione sekvence (IS) se sastoje od direktnih ili obrnutih ponovaka koji omogućavaju mobilnost i ugradnju genetičkog materijala, kao i njegovu stabilnost. U centru transpozona nalaze se geni za rezistenciju. Postoje dve klase transpozona. U klasu 1 spadaju transpozoni koji se transkribuju sa DNK u RNK i potom se putem reverzne transkripcije prevode u DNK molekul koji može da se ugradi u hromozom bakterijske ćelije. Klasa 2 transpozona koristi enzime transposaze kako bi mogla da premešta DNA transpozona duž hromozoma, ili sa jedne ćelije na drugu, mehanizmom rekombinacije. Samim tim, transpozoni mogu da se prenose sa jednog mesta na DNK molekulu na drugo ili sa jedne DNK na drugu (Bennett, 2008). Ako specifični geni u okviru transpozona kodiraju rezistenciju na više antibiotika nastaje multirezistentni fenotip. Bakterije sa plazmidima koji kodiraju multirezistenciju uzrokuju velike probleme u humanoj medicini, izazivajući brojne bolničke infekcije koje se teško leče antibioticima (Bennett, 2008). Poznato je da su neke

multirezistentne bakterije, interkontinentalno raširene i nađene u raznim ekološkim nišama u lancu proizvodnje hrane za životinje i ljude (Velhner i sar., 2014).

Genske kasete su mobilni genetički elementi koje mogu da funkcionišu kao slobodne, cirkularne i ne replikujuće DNK. Genska kasete najčešće ima samo jedan gen i dodatnu kratku sekvencu od 59 baza koja predstavlja specifično mesto za rekombinaciju. U veoma retkim slučajevima jedna kasete može da nosi dva gena. Ovakve kasete nastale su spajanjem dve kasete usled delecije. Geni na kasetama su najčešće eksprimirani preko promotora integrone zato što genske kasete nemaju svoj promotor (Bennett, 1999).

Integrone su mobilni genetički elementi integrisani u plazmide, transpozone ili plazmide. Mogu da ugrade u sebe, jednu ili više genskih kasete, koje su nosioci gena za rezistenciju. Geni za rezistenciju se ugrađuju u bakterijski genom mehanizmom rekombinacije. Rekombinacija se obavlja pomoću enzima integraze koju kodiraju *int1* geni. Integrone poseduju receptor *attI* za vezivanje i ugradnju genskih kasete. Sekvenca od 59 baza na genskoj kaseti prepoznaje receptor *attI* i ima ulogu u procesu rekombinacije (Bennett, 1999). Da li će rezistencija na antibiotike biti prenosiva i da li će se fenotipski manifestovati kao rezistencija na jednu ili više klasa antibiotika, zavisi od vrste i broja genskih kasete koje su ugrađene u integrone. Mobilni genetički elementi su nađeni kod velikog broja kliničkih izolata Gram negativnih bakterija, ali i komensala izolovanih iz životinja koje se uzgajaju na farmama (Bennett, 1999).

2.6. Mehanizmi rezistencije bakterija

Multirezistentne bakterije su postale globalni zdravstveni problem u kliničkoj mikrobiologiji jer dovode do samnjenja efikasnosti antibiotika kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini (Yue i sar., 2008). Bakterije koriste brojne mehanizme kako bi inhibirale delovanje antibiotika (Tabela 1). Najčeći mehanizmi rezistencije su (Habrun, 2014):

1. Inaktivacija antibiotika enzimima bakterije
2. Smanjenje propustljivosti ćelijskog zida bakterije
3. Genetička promena (mutacija) ciljnog mesta na bakterijskoj ćeliji ili njegova zaštita
4. Zaobilaženje metaboličkih procesa
5. Smanjenje unutarćelijskog nagomilavanja i zadržavanja antibiotika

Tabela 1. Mehanizmi delovanja antibiotika i funkcije gena rezistencije

Antibiotik	Mehanizam delovanja	Geni koji kodiraju rezistenciju	Funkcija gena za rezistenciju
β-laktami	Inhibiraju sintezu peptidoglikana	<i>bla</i>	Kodiraju β-laktamaze, enzime koji otvaraju β-laktamski prsten i inaktiviraju antibiotik
Hinoloni	Vezuju se za kompleks topozomerase II ili IV i blokiraju sintezu DNK	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>	Mutacije na genima onemogućavaju vezivanje antibiotika za kompleks DNK i topozomerase, replikacija bakterije se nastavlja
Hloramfenikol	Vrše acetilaciju hidroksilne grupe na C-3	<i>cat</i>	Kodira acetiltransferazu koja inaktivira hloramfenikol i sprečava njegovo vezivanje za ribozom
Aminoglikozidi	Vezuju se za aminoacil na A mestu 16S rRNK na 30S subjedinici ribozoma i inhibiraju sintezu proteina	<i>aac</i>	Enzimska modifikacija antibiotika
Sulfonamidi	Inhibiraju enzim DHPS i sintezu folne kiseline	<i>sul</i>	Kodira DHPS sa niskim afinitetom na sulfonamide
Tetraciklini	Sprečavaju vezivanje aminoacil tRNK na A mesto na ribozomu	<i>tet</i>	Kodira efluks pumpu da izbacuje tetracikline iz bakterije
Trimetoprim	Redukuju dihidrofolnu kiselinu (B9 vitamin) u tetrahidrofolnu kiselinu	<i>dfr</i>	Kodiraju varijantne enzime dihidrofolat reduktaze

2.6.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike

Beta-laktamski antibiotici imaju beta-laktamski prsten u svojoj strukturi, a deluju tako što inhibiraju sintezu peptidoglikana koji su sastavni deo zida bakterijske ćelije. To je velika grupa antibiotika na čelu sa penicilinom, kao i cefalosporinima, monobaktamima i karbapemenima.

Bakterije razvijaju rezistenciju na ovu grupu antibiotika tako što produkuju enzime beta-laktamaze, koji uništavaju beta-laktamski prsten penicilina i treće generacije cefalosporina. Kako bi se sprečilo delovanje navedenih enzima, beta-laktamski antibiotici se kombinuju sa inhibitorima beta-laktamaza, obično klavulonskom kiselinom.

Klasifikacija enzima beta-laktamaza po Ambleru izvršena je na osnovu molekularnih karakteristika odnosno sličnosti u sastavu amino kiselina. Enzimi beta-laktamaze koji hidrolizuju beta-laktamski prsten preko serina svrstani su u sledeće grupe: TEM, SHV, CTX-M, VEB, GES (molekularna klasa A), OXA (molekularna klasa D) AmpC (molekularna klasa C) i mnoge druge koji se ređe identifikuju kod izolata bakterija, a kodirani su sa plazmida. U grupi B su metalo-beta-laktamaze kojima je za aktivaciju potreban molekul cinka. Metalo-beta-laktamaze su veoma značajni enzimi zato što katalizuju hidrolizu svih beta-laktamskih antibiotika, osim monobaktama. Metalo-beta-laktamaze ne inhibiraju oni inhibitori (na primer, klavulonska kiselina, sublaktam i tazobaktam) koji su efikasni za beta-laktamaze čija aktivnost zavisi od molekula serina (Palzkill, 2013).

Funkcionalna klasifikacija enzima beta-laktamaza po Bush i Jacoby (2010) bazira se na podeli beta-laktamaza zavisno od njihove sposobnosti da hidrolizuju određene klase beta-laktama i na tome da li su bakterijske beta-laktamaze inhibirane sa klavulonskom kiselinom, tazobaktamom i/ili sublaktamom. Ova klasifikacija takođe omogućava da se novi enzimi lakše svrstaju u već postojeće ili nove funkcionalne subgrupe. U subgrupi 2b beta-laktamaza, nalaze se enzimi TEM-1, TEM-2 i SHV-1 koji hidrolizuju peniciline i starije generacije cefalosporina i inhibirani su klavulonskom kiselinom i tazobaktamom. Grupa enzima koja je u najvećem porastu i koji su diseminirani putem bakterija na celoj planeti je subgrupa 2be gde spadaju enzimi proširenog spektra beta-laktama (Bush i Jacoby, 2010). Familija beta-laktamaza CTX-M je od posebnog interesa za javno zdravlje zato što navedeni enzimi hidrolizuju prošireni spektar cefalosporina i monobaktam aztreonam, a inhibiraju ih klavulonska kiselina i tazobaktam (Paterson i Bonomo, 2005).

Geni koji kodiraju prošireni spektar beta-laktamaza (ESBL) mogu da budu locirani na hromozomu ili na plazmidima. Često se ciljni geni nalaze na konjugabilnim plazmidima u sadejstvu sa genima za rezistenciju na druge klase antibiotika, što uzrokuje multirezistenciju. Zahvaljujući tome što su geni koji kodiraju rezistenciju na beta-laktame većinom locirani na mobilnim genetičkim elementima, putem horizontalnog transfera gena za rezistenciju, dolazi do razmene plazmida između raznih vrsta bakterija i globalnog širenja ove vrste rezistencije kod bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* (Bevan i sar., 2017).

Kod izolata *E. coli* i *Klebsiella* spp. trenutno je najrasprostranjeniji enzim iz familije CTX-M. Gen *bla*_{CTX-M} se preneo putem horizontalnog transfera od *Kluyvera* vrsta bakterija prisutnih u zemljištu i vodi kod kojih se ovaj gen nalazi na hromozomu, a njegova mobilizacija je omogućena preko insercionih sekvenci, najčešće *ISEcp1* i *ISCR1*. Geni *bla*_{CTX-M} su locirani i na transpozonima, što takođe omogućava njihovu efikasnu diseminaciju u životnoj sredini (Chong i sar., 2011).

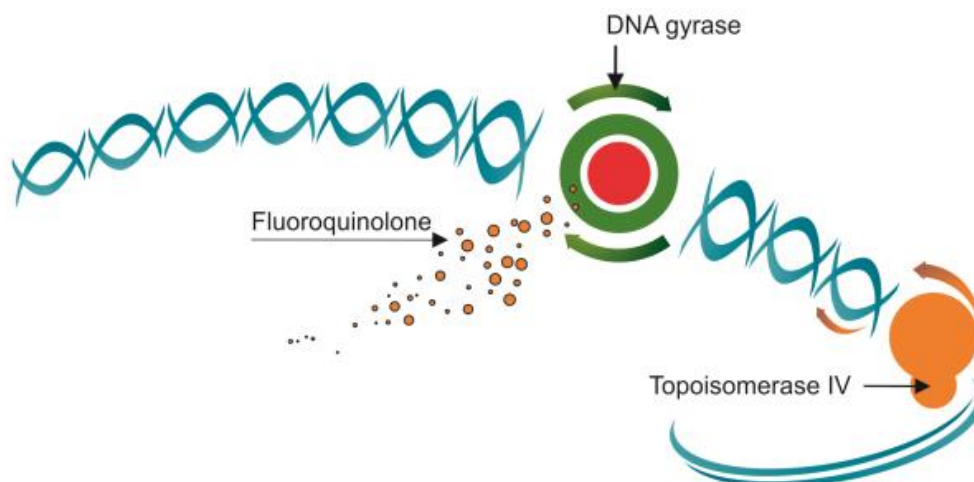
CTX-M grupa beta-laktamaza je danas najšire rasprostranjena i najraznovrsnija u pogledu specifičnih gena. Prema skorašnjim izveštajima u Italiji je najviše rasprostranjen gen CTX-M1, u Izraelu i Argentini CTX-M2 u Poljskoj CTX-M3, u Španiji CTX-M9, a CTX-M14 se često nalazi osim u Španiji i u Kini i Kanadi. Gen CTX-M15 rasprostranjen je bukvalno u celom svetu. CTX-M geni se na osnovu svoje amino kiselinske sličnosti dele u sledeće grupe: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 i CTX-M25 (Pitout i Laupland, 2008).

Posebno zabrinjava činjenica da se bakterije koje produkuju ESBL ne nalaze samo kod bolničkih izolata nego i kod domaćih i divljih životinja kao i u životnoj sredini. Pojava multirezistentne *E. coli* ST131 koja produkuje CTX-M15 takođe je rezistentna i na fluorohinolone. Ne samo da je ova *E. coli* multirezistentna nego pripada i filogenetskoj grupi B2, gde se nalaze ekstraintestinalne patogene *E. coli* tako da je jedna od najopasnijih uzročnika infekcija urinarnog trakta kod ljudi (Chong i sar., 2011).

Svakako da empirijska upotreba antibiotika značajno doprinosi razvoju rezistencije na prošireni spektar beta-laktama kao i činjenica da enviromentalne bakterije prisutne u zemljištu *Kluyvera* spp, produkuju CTX-M enzime koji inaktivišu ceoftaksim, a neke vrste inaktivišu i ceftazidim. Ciljni gen *bla*_{CTX-M} se kod *Kluyvera* spp. nalazi na mobilnom elementu *ISEcp1* (Pitout i Laupland, 2008).

2.6.2. Rezistencija na hinolone i fluorohinolone

Antibiotici iz grupe hinolona i fluorohinolona deluju na bakterijsku ćeliju tako što spečavaju funkciju enzima topoizmeraza (Slika 6). Topoizomeraze pripremaju hromozom za deobu tako što odvijaju lance DNK, uvodeći negativne navoje duž hromozoma. Navedeni enzimi takođe učestvuju u pakovanju udvostručenog lanca DNK i samim tim su neophodni za replikaciju bakterija (Hopkins i sar., 2005).



Slika 6. Mesto delovanja fluorohinolona u hromozomu bakterije

Topoizomeraze se dele na Girazu A i topoizomerazu IV. Oba enzima imaju po dve subjedinice, a kodirani su od strane dva gena i to, Girazu A kodiraju *gyrA* i *gyrB*, dok topoizomerazu IV kodiraju *parC* i *parE* geni. Mutacije koje uzrokuju rezistenciju na hinolone nastaju na delu gena koji se naziva region odgovoran za rezistenciju na hinolone (quinolone resistance determining region- QRDR). Samo jedna tačkasta mutacija na *gyrA* genu dovoljna je za nastajanje rezistencije na hinolone. Dve tačkaste mutacije na *gyrA* genu sa ili bez dodatnih mutacija na *gyrB*, *parC* i *parE* genima, uzrokuju rezistenciju i na fluorohinolone (Hopkins i sar., 2005).

Bakterije mogu da koriste i druge mehanizme rezistencije na ovu grupu lekova. Postoje eksperimentalni dokazi da je efluks pumpa primarni mehanizam rezistencije kod *Salmonella* Typhimurim, dok je kod ostalih serovarijeteta obično sekundarni mehanizma rezistencije (Giraud i sar., 2000). Efluks pumpu koriste bakterije da bi iz ćelije izbacile ne samo antibiotike nego i dezinficijense, teške metale i sve druge supstance koje su štetne za bakteriju. Navedeni mehanizam rezistencije nastaje ili zahvaljujući mutacijama na lokalnim regulatornim genima efluks pumpe ili zahvaljujući mutacijama na globalnim regulatornim genima. Kod *E. coli* najvažnija efluks pumpa je kodirana od strane *mar* operona. Navedeni operon se sastoji od dve funkcionalne jedinice i to *marC*, čiji mehanizam još nije razjašnjen i *marRAB* koji kodira MarR represor i MarA aktivator protein. SoxS aktivira i kontroliše rezistenciju na oksidativni stres dok je Rob protein konstitutivno eksprimiran i vezuje se za *oriC*. Samim tim MarA, SoxS i Rob aktiviraju više promotora koji koordiniraju rezistenciju na organske rastvarače i nešto nižu

rezistenciju na antibiotike. Razna jedinjenja poput nekih antibiotika, i jedinjenja sa fenolnim prstenom smanjuju funkciju MarR i aktiviraju *marRAB* operon. Regulacija lokalne *acrAB* efluks pumpe koja ima važnu ulogu kod nastanka rezistencije na antibiotike vrši se preko MarA. Isto tako mutacije na *acrR* (represorskom genu) dovode do povećane ekspresije gena *acrA* koji kodira AcrA protein, a prekomerna ekspresija *acrA* uzrokuje rezistenciju na više klasa antibiotika (Hopkins i sar., 2005). Postoje eksperimentalni dokazi da mnogobrojne hemikalije regulišu MarR, što znači da prirodna efluks pumpa može da bude aktivirana u velikom broju slučajeva kada se bakterija nađe u nepovoljnoj sredini (Alekhun i Levy, 1999). Poznate su i druge efluks pumpe koje su aktivirane kod nastanka rezistencije na hinolone, ali je njihov značaj uglavnom u sinregističkom delovanju sa AcrAB (Yang i sar., 2003).

Rezistencije na hinolone kod Gram negativnih bakterija može da nastane i preko ekspresije gena koji se nalaze na plazmidima (*qnr*). Geni sa plazmida (plasmid mediate quinolone resistance-PMQR) kodiraju specifične proteine ili enzime koji ne uzrokuju visoku rezistenciju na hinolone. Pridaje im se veliki značaj jer se navedeni geni nalaze često na konjugabilnim plazmidima zajedno sa drugim genima rezistencije ili su sastavni deo integrona i mogu lako da se prenose u životnoj sredini.

Proteini QNR spadaju u familiju proteina sa pentapeptidnim ponovcima i sadrže 218 aminokiselina. Ovi proteini štite girazu od antibiotika, a njihova karakteristika je da podržavaju druge mehanizme rezistencije na hinolone uključujući i nedostatak specifičnih porinskih kanala (Martínez-Martínez i sar., 2003; Hopkins i sar., 2005; Velhner, 2016). Prvi put su geni za rezistenciju na plazmidu detektovani od strane Martínez-Martínez i saradnika 1998. godine (Martínez-Martínez i sar., 1998). Gen je nazvan *qnrA*, a nađen je kod kliničkog izolata *Klebsiella pneumoniae*. Gen *qnrS* je detekovan u Japanu kod kliničkog izolata *Shigella flexneri* od strane Hata i saradnika 2005. godine (Hata i sar., 2005), a kod kliničkog izolata *Klebsiella pneumoniae* iz Indije, Jacoby i saradnici su 2006. godine detekovali *qnrB* gen (Jacoby i sar., 2006). Gen *qnrC* našli su Wang i saradnici kod kliničkog izolata *Proteus mirabilis*, 2009. godine u Šangaju u Kini (Wang i sar., 2009). Od izolata *Salmonella enterica* serovar Kentucky i Bovismorbificans od ljudi, identifikovan je *qnrD* gen od strane Cavaco i saradnika 2009. godine (Cavaco i sar., 2009).

Plazmidaska rezistencija na hinolone može takođe da nastane zahvaljujući enzimskoj modifikaciji antibiotika, a gen odgovoran za navedeni mehanizam rezistencije je *aac(6)-Ib-cr* i

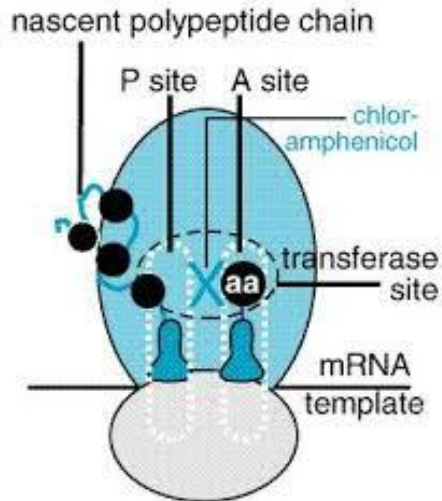
kodira rezistenciju na strukturno različite antibiotike odnosno na neke aminoglikozde i ciprofloksacin/norfloksacin. Gen *aac(6)-Ib-cr* je otkriven prilikom istraživanja rezistencije na hinolone koja je kodirana genima sa plazmida u SAD-u, od strane Robicsek i saradnika, 2006. godine, kod kliničkih izolata *E. coli* od hospitalizovanih pacijenata iz Kine. Gen *aac(6)-Ib-cr* je integron sa *attC* mestom i često je lociran na konjugabilnim plazmidima koji eksprimiraju CTX-M-15 kao i ostale beta-laktamaze i PMQR gene (Robicsek i sar., 2006; Strahilevitz i sar., 2009). Yamane i saradnici su 2008. godine utvrdili novi gen na plazmidu koji kodira efluks pumpu (*qepA*) kod *E. coli*, dok su od strane Hansena i saradnika 2004. godine kod kliničkih izolata *E. coli* utvrđeni *oqxA* i *oqxB* geni koji kodiraju transport antibiotika putem efluksa (Hansen i sar., 2004).

Horizontalni transfer gena koji kodiraju rezistenciju na hinolone predstavlja problem, sobzirom da navedeni mehanizmi rezistencije mogu da dovedu i do rezistencije na fluorohinolone (Martínez-Martínez i sar., 2003). Pored toga, navedeni geni se često nalaze kod izolata koji su rezistentni na prošireni spektar beta-laktamskih antibiotika, što omogućava razmenu genetičkog materijala između raznih vrsta bakterija u prirodi preko konjugabilnih plazmida (Hopkins i sar., 2005).

2.6.3. Rezistencija na hloramfenikol i florfenikol

Hloramfenikol je antibiotik širokog spektra delovanja čija je primena u kliničkoj praksi počela 1950. godine. Od 1994. godine u zemljama Evropske unije (EU) ovaj antibiotik je zabranjen za lečenje životinja koje se uzgajaju za ishanu ljudi (Schwarz i sar., 2004). Zabrana upotrebe hloramfenikola u stočarstvu u Srbiji počela je 2009. godine, mada se njegova upotreba značajno smanjivala još od 2000. godine (Jezdimirović, 2009).

Florfenikol je sintetički antibiotik i u svom molekulu sadrži flor na mestu hidroksilne grupe na C-3 atomu. Zahvaljujući lipofilnim karakteristikama florfenikol lako prodire u tkiva i danas se još uvek koristi u veterinarskoj medicini, kod goveda za lečenje pododermatitisa i u ribarstvu. Hloramfenikol i florfenikol deluju bakteriostatski zahvaljujući njihovom vezivanju za peptidiltransferazu na 50S subjednici ribozoma 70S (Schwarz i sar., 2004).

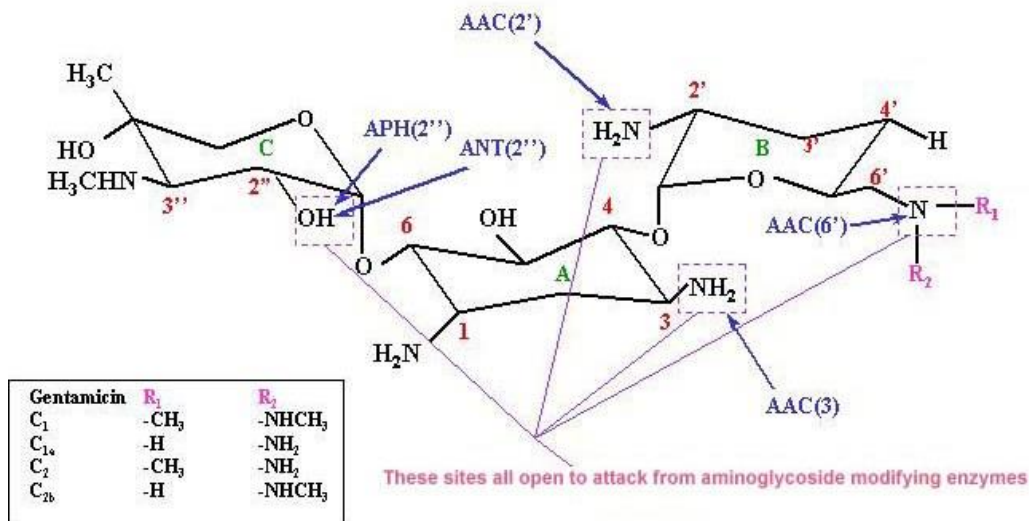


Slika 7. Mehanizam delovanja hloramfenikola

Rezistencija na hloramfenikol nastaje tako što bakterija vrši acetilaciju antibiotika, a za navedeni mehanizam potrebna je ekspresija *cat* gena koji kodiraju enzime hlorfenikol acetiltransferaze (CAT). Acetilacija hidroksilne grupe na C-3 nije moguća kod florfenikola zahvaljujući molekulu flora na C-3, tako da je florfenikol otporan na inaktivaciju putem CAT enzima. Samim tim bakterije koje su stekle rezistenciju na hloramfenikol putem enzima CAT su osetljive na florfenikol. Rezistencija može da nastane prilikom primene oba antibiotika i aktivnim izbacivanjem antibiotika van ćelije preko specifičnih eksportera. Za ovaj proces je odgovoran gen *cmlA* kao deo genske kasete sa sopstvenim promotorom. Njegova aktivacija nastaje putem inducibilne atenuacije translacije pri čemu je sam antibiotik inducer ekspresije gena. Za rezistenciju na florfenikol, ali i hloramfenikol, putem aktivnog transporta, odgovoran je i *floR* gen. Efluks pumpa (AcrAB-TolC) takođe može biti odgovorna za rezistenciju na oba antibiotika. Sistem transporta više vrsta antibiotika uključujući i hloramfenikol je takođe regulisan preko MdfA transportera. Navedeni sistem se sastoji od proteina RND familije (resistance nodulation division family of transporters), membranskih fuzionih proteina i spoljnih proteina (Schwarz i sar., 2004). Zahvaljujući tome što geni za rezistenciju na hloramfenikol i florfenikol mogu da budu locirani na mobilnim genetičkim elementima, rezistencija na ovu grupu antibiotika može da se razvije i zahvaljujući mehanizmu koselekcije u prisustvu drugih antibiotika za koje bakterije takođe imaju gene za rezistenciju.

2.6.4. Rezistencija na aminoglikozide

Antibiotici iz grupe aminoglikozida deluju tako što ometaju sintezu proteina u bakterijskoj ćeliji. Mehanizam delovanja zasniva se na njihovom vezivanju za aminoacil na A mestu 16S rRNK na 30S subjedinici ribozoma. Samim tim mutacije na genima rRNK koje bi onemogućile vezivanje antibiotika nisu moguće zato što kod svih organizama postoji više od jedne kopije gena koji kodiraju rRNK. Mutacije bi prema tome trebale da nastanu simultano na više gena ribozoma, a to se ne dešava u prirodi. Bakterije su našle druge načine da inaktiviraju aminoglikozide i to uglavnom putem enzimske modifikacije antibiotika. Tri grupe enzima koje vrše inaktivaciju dele se uglavnom prema tome na koji supstrat deluju odnosno gde vrše modifikaciju. Sledeće tri klase enzima aktivno doprinose razvoju rezistencije na aminoglikozide kod bakterija: aminoglikozid acetiltransferaze (AAC), aminoglikozid nukleotidiltransferaze (ANT) i aminoglikozid fosfotrasferaze (APH). U okviru navedenih grupa enzima nalaze se podgrupe enzima koje modifikuju različita mesta u molekulu aminoglikozida i to: četiri acetiltransferaza AAC(2'), AAC(6'), AAC(1) i AAC(3), četiri nukleotidiltransferaza ANT(6), ANT(4'), ANT(3'') i ANT(2''), dok fosfotrasferaza ima sedam i to APH(3'), APH(2'), APH(3''), APH(6), APH(9), APH(4) i APH(7'') (Kotra i sar., 2000).



Slika 8. Prikaz enzimske modifikacije gentamicina
(Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999;43:727-37)

Veoma rasprostranjen mehanizam rezistencije na streptomycin je inaktivacija antibiotika preko enzima aminoglikozid 3''fosfotransferaze i aminoglikozid 6''fosfotransferaze i preko genskih kaseti *aadA* koje kodiraju aminoglikozid adeniltransferaze i inaktiviraju streptomycin i spektinomycin, a često se nalaze na konjugabilnim plazmidima (Sunde i Norström, 2005).

Drugi mehanizmi rezistencije na aminoglikozide koje koriste bakterije su promena permeabilnosti membrane, efluks mehanizam i sasvim retko supstitucija nukleotida na ciljnom molekulu. Godine 2002. je u banku gena poslata sekvenca gena koji kodira 16S RNK metilazu (ArmA). Gen je nađen na plazmidu *Citrobacter freundii* u Poljskoj. Godine 2003. u Japanu je sekvenciran gen koji kodira enzim RmtA kod kliničkog izolata *Pseudomonas aeruginosa*. Oba gena (*armA* i *rmtA*) vrše metilaciju 16S rRNK, nemaju visoku sličnost aminokiselinskih sekvenci, ali se nalaze na transpozonima, a preneseni su horizontalnim transferom, najverovatnije od nepatogenih bakterija iz životne sredine (Doi i Arakawa, 2007).

2.6.5. Rezistencija na sulfonamide

Sulfonamidi su sintetički antibiotici koji su počeli da se koriste u kliničkoj praksi neposredno posle njihovog otkrića 1935. godine (Habrún, 2014). Danas se retko koriste u medicini, ali se još uvek geni za rezistenciju nalaze kod mnogobrojnih vrsta bakterija. Sulfonamidi deluju tako što inhibiraju sintezu dihidropteroat sintetaze (DPHS) zahvaljujući strukturnoj homologiji sa para-amino-benzoičnom kiselinom (PABA). Samim tim ometa se sinteza folne kiseline koja je neophodna za mnogobroje funkcije bakterijske ćelije. Obzirom da folna kiselina ne može da prođe kroz ćelijski zid bakterija, one moraju da je sintetišu same za svoje potrebe (Sköld, 2000).

Klinička rezistencija na sulfonamide kod Gram negativnih bakterija nastaje kada bakterije počnu da sintetišu alternativni DPHS za svoje potrebe. Tri do danas poznata gena *sul1*, *sul2* i *sul3* koja su locirana na plazmidima i/ili transpozonima omogućavaju sintezu alternativnog molekula DPHS kod bakterija. Postoje dva važna razloga zbog kojih je rezistencija na sulfonamide toliko rasprostranjena. Geni za rezistenciju se nalaze na mobilnim genetičkim elementima i produkti gena mogu da savladaju visoke koncentracije sulfonamida (Sköld, 2000).

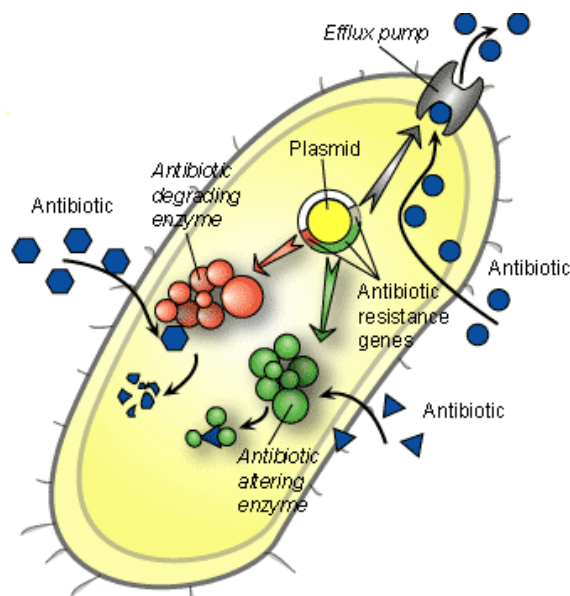
2.6.6. Rezistencija na trimetoprim

Trimetoprim je sintetički antibiotik koji u svojstvu strukturnog analoga folne kiseline kompetitivno inhibira redukciju dihidrofolne kiseline (B9 vitamin) u tetrahidrofolnu kiselinu preko enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR). Tetrahidrofolna kiselina je neophodna za sintezu timina, odnosno sintezu bakterijske DNK. Trimetoprim se vezuje na mesto dihidrofolat reduktaza i tako inhibira njegovo delovanje. Sulfonamidi i trimetoprim vrše svoje funkcije selektivno, odnosno ne ometajući funkcije drugih ćelija sisara, ali zato veoma efikasno ometaju metaboličke procese kod bakterija (Sköld, 2001).

Geni za rezistenciju na trimetoprim se obično nalaze na plazmidima ili drugim mobilnim genetičkim elementima, a bakterije ih nasleđuju od mikroorganizama iz okruženja, koji do sada nisu identifikovani. Geni *dfr* kodiraju varijantne enzime dihidrofolat reduktaze, koji su rezistentni na antibiotike i veoma su rasprostranjeni u životnoj sredini (Sköld, 2001).

2.6.7. Rezistencija na tetracikline

Tetraciklini su antibiotici koji deluju na bakterijsku ćeliju tako što sprečavaju vezivanje aminoacil tRNK na A mesto na ribozomu. Tetraciklini koriste katjon magnezijuma kako bi prošli kroz spoljnu membranu bakterijske ćelije i stigli do periplazme. Pretpostavlja se da tetraciklini mogu da prođu kroz lipidni omotač unutrašnje membrane citoplazme zahvaljujući svojoj slaboj lipofilnosti (Chopra i Roberts 2001). Bakterije poseduju *tet* gene koji kodiraju proteine efluks pumpe, zahvaljujući kojima bakterija može da ispumpa tetracikline van ćelje. Efluksni proteini izmenjuju proton za tetraciklin-magnezijum kompleks, koji se momentalno vezuje za gen represor, čime se aktivira operator i dolazi do konstitutivne ekspresije *tet* gena. U odsustvu tetraciklina, represorski protein se vezuje za operator i time efluks pumpa postaje neaktivna. Kompleks tetraciklin-magnezijum je najosetljiviji do danas poznat efektor - inducibilni sistem transkripcionih regulatora (Hillen i Berens, 1994).



Slika 9. Prikaz mehanizma efluks pumpe

Efluksni proteini su podeljeni u šest grupa na osnovu sličnosti amino kiselina. Najzastupljenija je grupa 1 u kojoj se nalaze sledeći efluks proteini: Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(Z), Tet(I), Tet(J), Tet(30). U grupi 2 nalaze se proteini efluksa Tet(K) i Tet(L) dok se u grupi 3 nalazi Otr(B) i Tcr3. U grupi 4 nalaze se TetA(P) izolata *Clostridia* spp. i Tet(V) od izolata *Mycobacterim smegmatis*. U grupi 6 se nalazi nedefinisan protein koji kao izvor energije koristi ATP, umesto protona (Hillen i Berens, 1994; Chopra i Roberts, 2001).

Sledeći značajan mehanizam rezistencije na tetracikline čine proteini citoplazme koji štite ribozom od tetraciklina uključujući i doksiciklin i minociklin. Enzimska inaktivacija tetraciklina se dešava preko Tet(X) proteina ali ona nije zastupljena toliko često kao prethodna dva mehanizma rezistencije (efluks i zaštita ribozoma).

Geni koji kodiraju rezistenciju na tetraciklin su mobilni zahvaljujući tome što mogu da se ugrade u transpozone i/ili konjugabilne plazmide. Time se objašnjava široka raspostranjenost rezistencije na tetracikline u prirodi. Nedavno su kod *Salmonella enterica* seovar Infantis izolata iz Srbije determinisani skraćeni transpozoni *Tn1721* na kome se nalazi *tetA* gen i njegov represorski gen *tetR* (Todorović i sar., 2015). Kod *E. coli* se *tetA* geni kao i drugi geni iz grupe 1 često nalaze na konjugabilnim plazmidima, dok se *tetM* i *tetO* geni češće nalaze na pokretnim hromozomalnim elementima (Chopra i Roberts, 2001).

2.7. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u svetu

U cilju očuvanja efikasnosti antimikrobne terapije širom sveta se sprovode intezivna sistematska, kontinuirana i multidisciplinarna naučna ispitivanja rezistencije bakterija prema antibioticima i hemioterapeuticima. Sveobuhvatna istraživanja usmerena su na detaljnije upoznavanje mehanizama rezistencije bakterija obuhvatajući utvrđivanje rezistotipa, utvrđivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za ciljne antibiotike, detekciju gena koji su odgovorni za nastajanje rezistencije, utvrđivanje tačkastih mutacija na genima koji uzrokuju rezistenciju na određene klase antibiotike, kao i identifikaciju lokalizacije gena rezistencije na plazmidima.

Rezultati istraživanja Yang i saradnika iz 2004. godine pokazuju veoma visoku prevalenciju rezistencije *E. coli* kod svinja u Kini. Kod ispitanih izolata utvrđena je najveća rezistencija na nalidiksinsku kiselinu 100%, tetraciklin 98%, sulfametoksazol 84%, ampicilin 79%, streptomycin 77% i trimetoprim-sulfametoksazol 76%, od ukupnog broja testiranih izolata. Zabrinjavajuća je visoka rezistencija na fluorohinolone, levofloksacin 64%, ciprofloksacin 79% i difloksacin 95%. Sekvenciranjem su detektovane tačkaste mutacije na *gyrA* i *parC* genima. Integroni klase 1 detektovani su kod 19% izolata svinja. Većina integrona nosila je gene koji kodiraju rezistenciju na streptomycin i trimetoprim (Yang i sar., 2004).

Hart i saradnici su 2004. godine sprovedi studiju ispitivanja rezistencije enteričnih bakterija, *E. coli*, *Campylobacter* spp. i *Enterococcus* spp. od svinja i svinjskog mesa u dva regiona Australije (Novi Južni Vels i Južna Australija). *E. coli* je ispoljila visoku otpornost prema tetraciklinu (100%) i umereno povišenu na ampicilin i sulfadiazin (30-60%). Ovakav rezultat odgovara činjenici da je tetraciklin najviše korišćeni antibiotik u svinjarskoj proizvodnji Australije. Rezistencija na fluorohinolone i cefalosporine III generacije nije utvrđena (Hart i sar., 2004).

Prema rezultatima istraživanja koje je objavio Japanski veterinarski sistem za nadzor antimikrobne rezistencije (JVARM) 2003. godine, prevalencija antimikrobne rezistencije *E. coli* poreklom od svinja, goveda i brojlera je visoka na sulfadimetoksin, oksitetraciklin i dihidrostreptomycin, ampicilin i kanamicin. Utvrđena je povećana rezistencija na fluorohinolone

(enrofloksacin) kod brojlera, sa vrednostima MIK 100mg/L, sa tendencijom opadanja, dok kod svinja i goveda nije bila otkrivena rezistencija na florohinolone (Kijima-Tanaka i sar., 2003).

Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* iz fecesa zdravih svinja, sa 20 farmi u državi Alberta, u Kanadi sprovedeno je tokom 2004. godine. Nađena je rezistencija na tetraciklin (66,8%), sulfametoksazol (46%), streptomycin (33,3%). Rezistencija na amoksisicilin-klavulonsku kiselinu, cefoksitin, ceftiofur, gentamicin i nalidiksinsku kiselinu je manja od 1%, dok su svi testirani izolati bili osetljivi na amikacin, ceftriakson i ciprofloksain. Ukupno 57% izolata *E. coli* je bilo rezistentno na dva i više antibiotika, dok je 21% izolata *E. coli* bilo osetljivo na sve antibiotike (Rosengren i sar., 2008).

Schroeder i saradnici su 2002. godine objavili rezultate svojih istraživanja o prevalenciji rezistencije *E. coli* O157 kod goveda, svinja i ljudi u državi Merilend, SAD. Rezistencija na tetraciklin je utvrđena kod 27%, na sulfametoksazol 26%, na cefalotin 17% i na ampicilin 13% ispitanih izolata *E. coli*. Ovakvi rezultati ukazuju na povećano korišćenje ovih antibiotika stočarskoj proizvodnji države Merilend (Schroeder i sar., 2002).

2.8. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u državama Evropske unije

Prema preporukama Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA), zemlje članice Evropske Unije su u obavezi da ispituju osetljivost bakterija na antibiotike kod 170 izolata na godišnjem nivou. Osetljivost na antibiotike se ispituje mikrodilucionom metodom (referentna metoda ISO 20776-1:2006 (E), pod naslovom: Kliničko laboratorijsko testiranje i *in vitro* dijagnostika osetljivosti infektivnih agenasa i evaluacija performansi metoda za praćenje osetljivosti bakterija na antibiotike) kod indikatorskih bakterija (*E. coli* i *Enterococcus faecalis/faecium*) i patogenih bakterija (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni/coli* i *Staphylococcus aureus*) od životinja koje se koriste za proizvodnju hrane za ljude. Uzorkovanje se vrši u klanicama, maloprodajama i populacijama životinja slobodnih od bolesti (EFSA, 2012).

Prema EFSA izveštajima iz 2015. godine ispituje se rezistencija na cefalosporine treće generacije i karbapeneme kod reprezentativnog broja izolata *E. coli* poreklom od svinja, goveda i goveda mlađih od godinu dana u zemljama članicama EU. Drugi panel se odnosi na detekciju indikatorske *E. coli* koja produkuje ESBL korišćenjem selektivnih podloga sa 1mg/L CTX. U analize su uključeni izolati iz mesa i cekuma životinja na klanici i mesa u maloprodaji. Broj

izolata *E. coli* rezistentnih na cefalosporine treće generacije nije visok u zemljama članicama EU, a u deset država nije utvrđena rezistencija na cefotaksim i ceftazidim kod izolata *E. coli* od svinja u tovu, kao i na meropenem i ertapenem. Iz uzoraka svežeg svinjskog mesa iz maloprodaje testirano je ukupno 5350 uzoraka u 22 države. Od toga je 7% uzoraka imalo ESBL fenotip, 2,3% AmpC fenotip, a kombinaciju fenotipa ESBL/AmpC 0,4% izolata. Dvadesetsedam država članica EU ispitalo je 6167 uzoraka cekuma na prisustvo *E. coli* koja produkuje ESBL (koristeći selektivne podloge). Od toga 31,9% uzoraka je bilo pozitivno na *E. coli* koja produkuje ESBL fenotip, a kod 9,7% izolata utvrđen je AmpC fenotip. Samo 1,5% izolata imalo je kombinaciju ESBL/AmpC (EFSA, 2017).

U 23 države članice EU testirano je ukupno 5329 uzoraka svežeg goveđeg mesa iz maloprodaje. ESBL fenotip je utvrđen kod 5% izolata, AmpC fenotip kod 1,8% izolata, a kombinacija ESBL/AmpC je nađena kod 0,3% izolata *E. coli*. Kod goveda mladih od godinu dana u devet država članica EU, ispitano je ukupno 2343 uzorka cekuma i od toga je 36,8% izolata *E. coli* bilo pozitivno na ESBL, 4,8% izolata *E. coli* je bilo pozitivno na AmpC fenotip, a 2,0% izolata je imalo ESBL/AmpC fenotip. U Italiji je *E. coli* koja produkuje ESBL testirana genotipski i identifikovan je gen koji kodira CTX-M-1 enzim (EFSA, 2017).

Podaci Hammerum i saradnika iz 2007. godine, pokazuju da je godišnja potrošnja fluorohinolona u Danskoj bila 114 kg. Zakonodavstvo je 2002. godine ograničilo upotrebu fluorohinolona i cefalosporina u stočarskoj proizvodnji, osim u slučajevima infekcija uzrokovanim patogenim bakterijama koje su otporne na sve ostale antibiotike. Nakon primene ovog zakona potrošnja fluorohinolona je smanjena na 18 kg u 2005. godini. Zakonom iz 2005. godine, upotreba fluorohinolona i cefalosporina je u potpunosti zabranjena, što je naročito značajno u intenzivnom uzgoju svinja jer svinjarska proizvodnja čini 82% stočarske proizvodnje u Danskoj (Hammerum i sar., 2007). Primenom ovog zakona, Danska je jedina država članica EU koja je potpuno zabranila korišćenje ovih antibiotika, što pokazuje i publikacija Hendriksen i saradnika iz 2008. godine (Hendriksen i sar., 2008).

U periodu od 2002-2004. godine Hendriksen i saradnici su spaveli studiju koja je imala za cilj kontinuirano praćenje rezistencije patogenih bakterija i komensalne *E. coli*, u kojoj je učestvovalo 12 država članica EU. Španija je imala najveću prevalenciju rezistencije na ampicilin, streptomycin, sulfonamide, tetraciklin i nalidiksinsku kiselinu. Najzabrinjavajuća je

bila ustanovljena prevalencija rezistencije na fluorohinolone u Portugaliji (prosečno 48% za period 2002-2004. godine), dok su svi testirani izolati u Danskoj bili senzitivni. Rezistencija *E. coli* poreklom od bolesnih svinja na cefalosporine IV generacije (ceftiofur) nađena je u Belgiji (prosečno 1,5% za period 2002-2004. godine), dok je najveća rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol detektovana u Holandiji i Belgiji (preko 70% za period 2002-2004. godine). Najveću prevalenciju rezistencije na gentamicin i hloramfenikol imala je Portugalija (48%), a na neomicin Danska (Hendriksen i sar., 2008).

Rezultati ispitivanja rezistencije *E. coli* poreklom od goveda, svinja i živine objavljeni su 2003. godine iz Nemačke. Značajno veća prevalencija rezistencije bila je kod izolata *E. coli* od svinja (60%), nego od goveda (25%), i to na ampicilin (detektovan gen *bla_{TEM-1}* kod 92%), streptomycin (detektovani geni *aadA1* kod 61% i *straA/B* kod 59%), sulfonamide (detektovani geni *sul2* kod 66%, *sul1* kod 42% i *sul3* kod 14%) i tetraciklin (detektovani geni *tetA* kod 66% i *tetB* kod 42%). Integroni klase 1 nađeni su kod 30% izolata sa genima za rezistenciju: *dfrA1-aadA1a*, *aadA1*, *sat1-aadA1a*, *dfr17-aadA5*, *oxa1-aadA1a* i *dfrA12-aadA1a* (Guerra i sar., 2003).

Upotreba antibiotika u Velikoj Britaniji na godišnjem nivou iznosi 440-480 tona. Polovinu ove količine čine tetraciklini, a drugu polovinu dele sulfonamidi, aminoglikozidi, beta-laktami, makrolidi i fluorohinoloni. Prevalencija antimikrobne rezistencije je različita kod različitih vrsta životinja koje se intenzivno gaje za proizvodnju hrane za ljude. Kod svinja je bila 92,1%, dok je kod goveda neuporedivo manja 5,7%. Kod komensalne *E. coli* svinja najveća rezistencija je otkrivena na tetraciklin, jer se najviše primenjuje u svinjarstvu (78,7%), zatim na sulfonamide 66,9% i streptomycin 37,5%, dok je na ceftazidim 0,1%. Najčešće su detektovani geni: *tetB*, *sul2*, *strA* i *strB*. Rezistencija na fluorohinolone nije nađena (Enne i sar., 2008).

Thorsteinsdottir i saradnici su 2008. godine publikovali rezultate ispitivanja osetljivosti izolata *E. coli*, poreklom od zdravih svinja i brojlera, mesa svinja i brojlera, kao i osoblja zaposlenog na klanicama i bolničkih pacijenata na Islandu. Rezultati pokazuju visoku prevalenciju antimikrobne rezistencije kod svinja 54% i brojlera 52%, kao i radnika u klanicama 39%, dok je prevalencija rezistencije kod bolničkih pacijenata bila 23,1%. Najviše zastupljena rezistencija kod svinja bila je na tetraciklin 36%, sulfametoksazol 31%, i streptomycin 25%, kod brojlera na sulfametoksazol 21%, ciprofloksacin 20% i nalidiksinsku kiselinu 20%, dok je kod radnika u klanicama i bolničkih pacijenata na ampicilin 6-8% (Thorsteinsdottir i sar., 2008).

2.9. Prevalencija antimikrobne rezistencije životinja u Republici Srbiji i državama okruženja

Rezultati ispitivanja osetljivosti *E. coli* poreklom od goveda i svinja, na antibiotike iz veterinarskih mikrobioloških laboratorija u Republici Srbiji i država okruženja, pokazuju da je trend rasta rezistencije prisutan i na antibiotike koji se koriste u humanoj medicini, prvenstveno na fluorohinolone, cefalosporine i gentamicin. Iz navedenih razloga je veoma značajno da se prati pojava rezistencije i utvrde mehanizmi rezistencije kako bi se sagledao rizik od širenja multirezistentnih bakterija kod životinja, ali i kod ljudi.

Krnjaić i saradnici su 2005. godine sproveli veoma opsežno ispitivanje osetljivosti sojeva *E. coli*, izolovanih iz intenzivnih uslova proizvodnje širom Srbije na 42 farme i utvrdili prisustvo rezistencije prema svim antibioticima, izuzev prema cefalosporinima III generacije i kolistinu. Ustanovljena prevalencija rezistentnih sojeva *E. coli* prema određenim antibioticima i hemioterapeuticima bila je značajno različita u zavisnosti od starosti i vrste životinja. Viši procenat rezistentnih sojeva prisutan je kod sojeva *E. coli* izolovanih od bolesnih u odnosu na zdrave, kao i od mladih u odnosu na starije životinje. Izuzetno visok procenat rezistencije utvrđen je kod sojeva *E. coli* izolovanih od teladi sa prolivom, prasadi i od živine. Prevalencija multirezistentnih sojeva *E. coli* značajno se razlikovala unutar izolovanih sojeva *E. coli* u zavisnosti od različitih kategorija i vrsta životinja i iznosila je kod goveda od 15% do 80%, svinja od 40% do 95% i živine od 45% do 95% (Krnjaić i sar., 2005).

Ispitivanje prevalencije antimikrobne rezistencije kod komensalne *E. coli*, od domaćih životinja koje se uzgajaju za ishranu ljudi u Vojvodini, publikovano je 2008. godine. Uglavnom je ustanovljena rezistencija na starije klase antibiotika, a multirezistencija (na ≥ 2 antibiotika) je nađena kod svih izolata poreklom od svinja, kod 63,2% izolata od živine i 37,5% izolata od goveda. Najzastupljenija je bila rezistencija na tetraciklin, a potom u manjoj meri na streptomycin, ampicilin, cefalotin i nalidiksinsku kiselinu (Knežević i Petrović, 2008).

Urumova i saradnici su 2013-2014. godine sproveli istraživanje rezistencije komensalne *E. coli* iz fekalnih briseva svinja u Bugarskoj. Najveća prevalencija rezistencije (72%) bila je kod tetraciklina, kodirana genom *tetA* kod 96,4% izolata, dok je kod 4,6% izolata detektovan *tetB*

gen. Pored tetraciklina, najčešće zastupljena rezistencija bila je na amoksisilin, streptomycin, spektinomycin i sulfametaksazol (Urumova, 2016).

Podatke o rezistenciji *E. coli* poreklom od teladi i prasadi publikovala je i grupa istraživača iz Rumunije 2017. godine. Od ukupnog broja testiranih izolata, u periodu 1980-2016. godine, najzastupljenija je rezistencija u kombinaciji tetraciklin-streptomycin (37%), zatim u kombinaciji tetraciklin-sulfonamidi (21%). Multirezistencija u kombinaciji ampicilin-streptomycin-tetraciklin-sulfonamidi, zastupljena je kod samo 8% ispitanih izolata. Detektovani su geni *tetA*, *tetB* i *tetC* odgovorni za rezistenciju na tetraciklin kao i gen *sulI* odgovoran za rezistenciju na sulfonamide (Chirila i sar., 2017).

Na osnovu istraživanja koje su sproveli Bilić i saradnici 1990. godine u Republici Hrvatskoj, rezistencija *E. coli* poreklom od svinja na neomicin je iznosila 22%, na gentamicin 27,5%, dok rezistencija na fluorohinolone nije uočena. U periodu 1997-1998. godine Bilić i saradnici zapažaju rezistenciju na fluorohinolone kod 29,7%, i porast prevalencije rezistencije na neomicin kod 56% i na gentamicin kod 49,7% ispitanih izolata *E. coli* (Bilić i sar., 1999).

Habrun i saradnici u svom istraživanju 2011. godine zapažaju značajan porast rezistencije *E. coli*, poreklom od svinja iz intenzivne proizvodnje u Republici Hrvatskoj. Porast prevalencije rezistencije izolata *E. coli* je prema neomicinu 70% i gentamicinu 50%, u odnosu na predhodna istraživanja Bilića i saradnika iz 1990. i 1997-1998. godine. Najviše zabrinjava porast rezistencije na fluorohinolone (enrofloksacin) kod 58% ispitanih izolata. Porast rezistencije zastupljen je i kod ampicilina, tetraciklina, streptomicina i trimetoprim-sulfametaksazola, dok je 94% izolata *E. coli* osetljivo na kolistin (Habrun i sar., 2010).

Prva istraživanja prevalencije rezistencije *E. coli* na antibiotike kod domaćih životinja u Republici Srbiji sproveli su Krnjaić i saradnici 2000. godine (Krnjaić, 2000), ali do sada nije urađena detaljna karakterizacija mehanizama rezistencije *E. coli* na antibiotike, odnosno ispitivanje prisustva mutacija u genomu, kao i specifičnih gena rezistencije u oblasti kliničke veterinarske mikrobiologije. Kako je sama pojava i raširenost rezistencije na antibiotike u direktnoj vezi sa količinom upotrebljenih antibiotika i hemioterapeutika, neophodno je kod indikatorskih mikroorganizama, pre svega kod *E. coli*, uspostaviti monitoring rezistencije prema svim klasama antibiotika, uključujući i fluorohinolone i cefalosporine treće i četvrte generacije.

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na aktuelnost i značaj problematike antimikrobne rezistencije neosporno je da postoji naučna opravdanost i potreba za izučavanjem mehanizama rezistencije sojeva *E. coli* izolovanih od domaćih životinja, kao i utvrđivanje značaja po zdravlje životinja i ljudi od infekcija rezistentnim sojevima i mogućeg transfera gena rezistencije.

Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Utvrđivanje pojave multirezistencije kod izolata *E. coli* od svinja i iz mleka krava sa kliničkim mastitisom primenom disk difuzionog testa.
2. Utvrđivanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika prema izolatima *E. coli* primenom mikrodilucione metode u bujonu.
3. Utvrđivanje filogenetske pripadnosti multirezistentih izolata *E. coli* određenim filogenetskim grupama A, B1, B2 i D metodom lančane reakcije polimeraze.
4. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata *E. coli* metodom elektroforeze u pulsnom polju i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD).
5. Utvrđivanje prisustva gena *E. coli* koji kodiraju rezistenciju na određene klase antibiotika metodom lančane reakcije polimeraze.
6. Detekcija tačkastih mutacija na genima *E. coli* koji kodiraju enzime topizomeraze, a koje uzrokuju rezistenciju na hinolone.
7. Detekcija gena *E. coli* odgovornih za rezistenciju na hinolone kodiranih sa plazmida metodom lančane reakcije polimeraze.
8. Utvrđivanje zastupljenosti integraza 1 i 2 i integrona 1 i 2 kod izolata *E. coli* metodom lančane reakcije polimeraze.
9. Utvrđivanje genetičkog sastava integrona, sekvenciranjem PCR produkata „primer walking“ metodom i analiziranje sekvenci korišćenjem softver programa.
10. Ispitivanje mogućnosti prenosa plazmida između bakterija putem konjugacije i detektovati gene koji se nalaze na konjugabilnim plazmidima metodom lančane reakcije polimeraze sa specifičnim prajmerima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

Materijal u toku istraživanja prikupljen je sa farmi goveda i svinja industrijskog tipa kao i privatnih gazdinstva sa teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine, izuzev jednog poljoprivrednog gazdinstva, koje se nalazilo u Mačvanskom upravnom okrugu centralne Srbije. Uzorci u okviru istraživanja predstavljali su mleko krava sa kliničkim mastitisom kao i feces i rektalni brisevi bolesne odlučene prasadi i tovljenika.

Tokom 2013. i 2014. godine na Odeljenju za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu mikrobiološkim ispitivanjima obuhvaćena su 104 uzorka mleka uzetih od krava sa kliničkim mastitisom, kao i 283 uzorka poreklom od bolesne odlučene prasadi i tovljenika.

Od 104 uzorka mleka krava, 41 je poticalo sa privatnih gazdinstava koja su gajila do 10 muznih krava, dok su 63 prikupljena na velikim farmama sa prosečno 300 grla. Pre uzimanja uzoraka mleka, papile vimena su dezinfikovane 70% etanolom. Uzorci mleka uzimani su iz pojedinačnih četvrti vimena muznih krava u sterilne plastične tube (Dunavplast, Indija, Srbija) i donošeni na Odeljenje za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu.

Od 283 uzoraka bolesne odlučene prasadi i tovljenika 39 uzoraka bili su rektalni brisevi, od kojih je 25 poreklom sa velikih farmi sa više od 1000 jedinki, dok je 14 poticalo sa privatnih gazdinstava sa manje od 100 jedinki. Plastičnim brisevima (Copan, Italija), uzimani su brisevi direktno iz rektuma svinja i donošeni na Odeljenje za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu.

4.2. METODE

4.2.1. Izolacija i identifikacija *E. coli*

Izolacija i identifikacija sojeva *E. coli* sa navedenih farmi muznih krava i svinja izvedena je klasičnim mikrobiološkim metodama.

Po 50 µL prethodno homogenizovanog mleka zasejano je na Columbia agar (CM0331; Oxoid, Basingstoke, UK) sa dodatkom 5% defibrinisane ovčije krvi i na McConkey agar (CM007; Oxoid, Basingstoke, UK). Tako zasejane podloge inkubirane su 24h u inkubatoru na temperaturi od 37°C.

Plastični rektalni brisevi inokulirani su u po 9 mL peptonske vode (CM0509; Oxoid, Basingstoke, UK) i homogenizovani u trajanju od 20 do 30 sekundi. na vorteksu (Labnet, SAD) Nakon toga, po 50 µL tako homogenizovanog uzorka zasejano je na MacConkey agar (CM007; Oxoid, Basingstoke, UK). Zasejane podloge inkubirane su u termostatu 24h na temperaturi od 37°C.



Slika 10. Izgled kolonija *E. coli* na McConkey agaru nakon 24h inkubacije na 37°C

Nakon porasta tipičnih kolonija *E. coli*, pojedinačne kolonije presejane su na hranljivom agar (CM0003; Oxoid, Basingstoke, UK) i inkubirane u inkubatoru 24h na 37°C. Posle prečnoćne inkubacije na hranljivom agaru, urađeni su biohemijski testovi za ispitivanje biohemijskih osobina *E. coli*: oksidaza test (negativan), katalaza test (pozitivan), fermentacija glukoze i laktoze, kao i sposobnost produkcije sumporvodonika (H₂S), pomoću trostrukog

Kliglerovog šećera. Za identifikaciju *E. coli* korišćene su podloga za indol, podloga za Voges Proskauer reakciju, podloga za citrat, ureu, kao i metil crvenu reakciju. Potvrda izolata *E. coli* urađena je komercijalnim identifikacionim testom BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit (Becton Dickinson, SAD).

4.2.2. Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* na antibiotike disk difuzionom metodom na agaru

Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* prema antibioticima vršeno je disk difuzionom metodom na agaru u skladu sa standardom M100-S25 Instituta za klinička i laboratorijska ispitivanja (Clinical and laboratory Standards Institute) (CLSI, 2015a).

Nakon porasta tipičnih kolonija *E. coli* na McConkey agaru (CM007; Oxoid, Basingstoke, UK), nekoliko pojedinačnih kolonija (iste morfologije) presejano je na hranljivi Tripton soja bujon (Oxoid, Basingstoke, UK) i inkubirano u inkubatoru 24h na 37°C. Od ovako pripremljene prekonoćne kulture *E. coli* u hranljivom bujonu i fiziološkog rastvora natrijum hlorida (NaCl), napravljen je uz upotrebu McFarland denzitometra (Bioscan, Riga, Latvia). Inokulum suspenzije bakterija gustine McFarland 0,5 koji je sadržavao 1×10^8 CFU/mL. Inokulum je plastičnim brisevima (Copan, Italija) razmazivanjem nanet na Mueller-Hinton agar (CM0405; Oxoid, Basingstoke, UK), debljine 4 mm. Na ovako nanešen inokulum suspenzije *E. coli* postavljeni su diskovi, impregnirani antibioticima u koncentraciji: ampicilin 10 µg (AMP), amoksisicilin sa klavulonskom kiselinom 20 µg + 10 µg (AMC), hloramfenikol 30 µg (CHL), ciprofloksacin 5 µg (CIP), gentamicin 10 µg (GEN), nalidiksinska kiselina 30 µg (NAL), streptomycin 10 µg (STR), sulfonamidi 300 µg (SA), tetraciklin 30 µg (TET), trimetoprim sa sulfametoksazolom 1,25 µg + 23,75 µg (SXT), trimetoprim 5 µg (TMP), cefpodoksim 10 µg (CPD), cefotaksim 30 µg (CTX) i ceftazidim 30 µg (CAZ), proizvođača BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska.



Slika 11. Materijal potreban za izvođenje disk difuzione metode na agaru

Nakon prekonoćne inkubacije na 37°C, očitavane su zone inhibicije u milimetrima pomoću lenjira.

Ispitivanje produkcije enzima proširenog spektra beta-laktama kod izolata *E. coli* (ESBL produceri), izvedeno je pomoću testa synergizma antibiotika, disk difuzionom metodom, u skladu sa standardom M100-S25 Instituta za klinička i laboratorijska ispitivanja (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI). Test je izveden sa antibioticima cefotaksim 30 µg i cefotaksim/klavulonska kiselina 30 µg + 10 µg, kao i ceftzidim 30 µg i ceftazidim/klavulonska kiselina 30 µg + 10 µg. Diskovi antibiotika postavljeni su u razmaku od 25 mm jedan od drugoga (od centra diska do centra diska). Nakon prekonoćne inkubacije na 37°C, očitavane su zone inhibicije lenjirom.

4.2.3. Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* na antibiotike mikrodilucionom metodom u bujonu

Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* prema antibioticima vršeno je mikrodilucionom metodom u bujonu, određivanjem minimalne koncentracije antibiotika koja inhibira rast bakterija (MIK), u skladu sa standardom M007-A10 Instituta za klinička i laboratorijska ispitivanja (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2015b).

Mikrodiluciona metoda u bujonu izvedena je u polistirenskim mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) u laminarnoj komori. Kod izolata *E. coli* ispitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za sledeće antibiotike: ampicilin, amoksicilin, amoksicilin sa klavulonskom kiselinom, hloramfenikol, ciprofloksacin, gentamicin, nalidiksinska kiselina, streptomycin, sulfametoksazol, tetraciklin, trimetoprim, cefotaksim, ceftazidim i florfenikol (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Nemačka). Tokom ispitivanja osetljivosti izolata *E. coli* prema antibioticima, kao kontrola je korišćen referentni soj *E. coli* ATCC 25922.

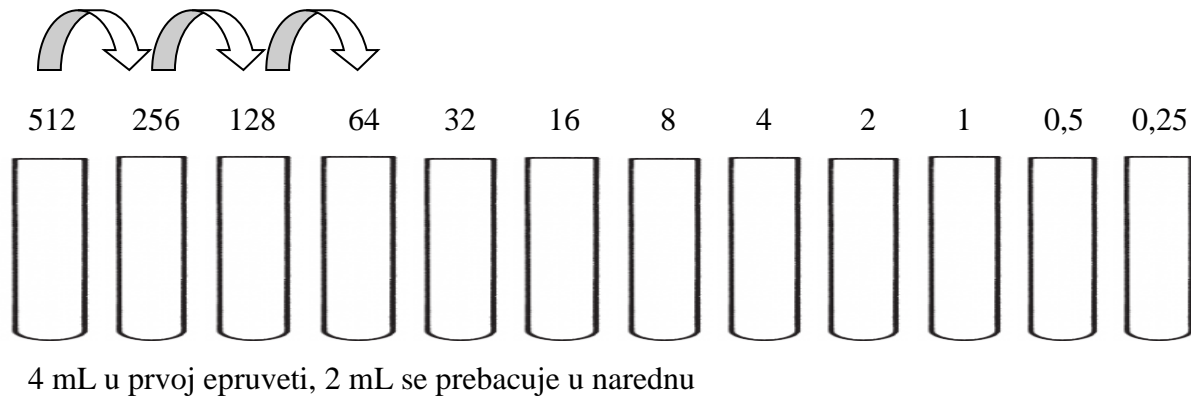


Slika 12. Materijal potreban za izvođenje mikrodilucione metode u bujonu

Pre izvođenja ove metode, u Mueller-Hinton bujon (CM0405; Oxoid, Basingstoke, UK), dodati su rastvori katjona magnezijum-hlorida ($MgCl_2$), u koncentraciji 20-25 mg/L i kalcijum hlorida ($CaCl_2$), u koncentraciji 10-12,5 mg/L. U ovako pripremljeni Mueller-Hinton bujon dodat je rastvoreni antibiotik u adekvatnoj početnoj koncentraciji (mg/L), koja se određuje pomoću standarda CLSI. Antibiotici su odmeravani na analitičkoj vagi sa 5 decimala (Radvag, Radom, Poland). Za rastvaranje antibiotika korišćeni su rastvarači prema uputstvima farmakopeje, dok je količina Mueller-Hinton bujona zavisila od broja izolata koji se ispituje.

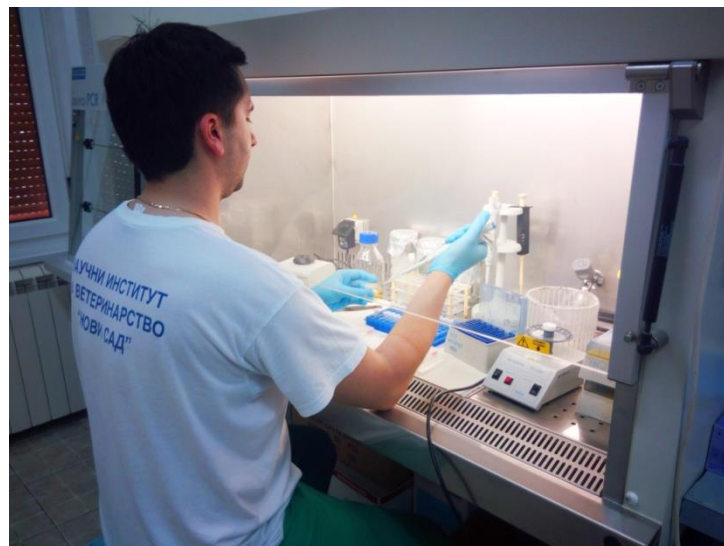
Pripremljeni Mueller-Hinton bujon sa antibiotikom razliven je u seriji od 12 plastičnih epruveta, zapremine 16 mL (Dunavplast, Indija, Srbija). U prvoj epruveti bilo je 4 mL, a u ostalim po 2 mL Mueller-Hinton bujona sa antibiotikom. Iz prve epruvete, sterilnom plastičnom pipetom za jednokratnu upotrebu, 2 mL Mueller-Hinton bujona sa antibiotikom, prebačeno je

dispenzorom u narednu epruvetu i dobro homogenizovano na vorteksu. Ovakav postupak ponavljan je do kraja niza od 11 epruveta čime je dobijena serija dvostrukih razređenja određenog antibiotika u koncentraciji na primer: 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; i 0,25 mg/L (šema 1). Za svako razređenje korišćena je nova sterilna pipeta. U 12. epruveti bio je Mueller-Hinton bujon bez antibiotika, koji je služio za kontrolu podloge.



Šema 1. Prikaz serije dvostrukih razređenja u epruvetama

Po 100 μ L ovako napravljenih razređenja Mueller-Hinton bujona sa antibiotikom, zasebnim sterilnim nastavcima (Sarsted, Numbrecht, Nemačka) nanešeno je vertikalno, u bazenčiće mikrotitracionih ploča.



Slika 13. Izvođenje mikrodilucione metode u bujonu, u laminarnoj komori



Slika 14. Nanošenje inokuluma u bazene mikrotitracionih ploča

Od unapred pripremljene prekonoćne kulture *E. coli* u hranljivom Tripton soja bujonu (Oxoid, Basingstoke, UK) i fiziološkog rastvora natrijum hlorida (NaCl), napravljen je inokulum suspenzije bakterija, gustine McFarland 0,5, odnosno 1×10^8 CFU/mL na McFarland denzitometru. Napravljena suspenzija bakterija McFarland 0,5 razređena je 1:20, čime je dobijena suspenzija bakterija gustine 5×10^6 CFU/mL, odnosno u 1,9 mL fiziološkog rastvora dodato je 100 μ L suspenzije bakterija McFarland 0,5. Po 10 μ L inokuluma *E. coli* dodato je horizontalno svakom bazenčiću mikrotitracione ploče, zasebnim sterilnim nastavcima. Ploče su inkubirane u inkubatoru 24h na 37°C. Utvrđivanje MIK-a je vršeno golim okom i predstavlja prvo razređenje u kome nema vidljivog rasta bakterija. Potvrda vrednosti MIK-a izvršena je očitavanjem ekstinkcija na spektrofotometru (Asys, Cambridge, UK).

4.2.4. Detekcija gena rezistencije izolata *E. coli* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

1. Ekstrakcija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK)

Ekstrakcija DNK urađena je od unapred pripremljene prekonoćne kulture bakterija *E. coli* na hranljivom Tripton soja bujonu (Oxoid, Basingstoke, UK). Zapremina od 1,5 mL prekonoćne kulture *E.coli* prebačena je u plastične mikrotube, zapremine 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Centrifugiranjem u centrifugi (Witeg Labortechnik GmbH, Koreja) na 13500 rpm,

bakterije su sedimentirane na dno, a supernatant odbačen. Sa 200 μL dejonizovane vode talog je rastvoren, a zatim su mikrotube držane u ključaloj vodi tokom 5 minuta. Nakon toga, mikrotube su stavljene na pripremljeni led u trajanju od 10 minuta. Centrifugiranjem na 13500 rpm dobijen je supernatant u kome je ekstrahovana DNK.

Za potrebe metode sekvenciranja, kao i metode nasumične amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD), DNK izolata *E. coli* ekstrahovana je komercijalnim setom za ekstrakciju DNK (QiAamp DNA Mini Kit, proizvođača Qiagen, Hilden, Nemačka).

2. Priprema reakcione smeše

Za pravljenje reakcione smeše korišćen je komercijalni set (Qiagen, Hilden, Nemačka) koji u sebi sadrži 1,5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP, i 2,5 U HotStart Taq DNA polimeraze spremne za 1 x PCR puffer. U plastičnu mikrotubu zapremine 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), pomešane su komponente u sledećim količinama po uzorku: 12,5 μL HotStart Taq Master Mix-a, 0,25 μL forward prajmera, 0,25 μL reverse prajmera (prikazanih u Tabeli 3) i 7 μL ddH₂O vode. Ovako napravljena mastermiks mešavina ruspendovana je u mikrotube, zapremine 0.5 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), u koje je nakon toga dodato po 5 μL ekstrahovane DNK po uzorku. Pri svakoj PCR reakciji korišćena je jedna pozitivna i jedna negativna kontrola.



Slika 15. Priprema mastermiks mešavine u PCR komori

Nakon kratkog centrifugiranja u mikrosprin centrifugi (Bioscan, Litvanija), uzorci su stavljeni u aparat Thermal cycler TECHNE (Bibby Scientific LTD, Velika Britanija) po protokolu i optimalnim uslovima za izvođenje PCR metode (prikazani u Tabeli 2).



Slika 16. Termosajkliranje u PCR aparatu

Tabela 2. Optimalni uslovi za izvođenje PCR metode, za korišćene prajmere iz Tabele 3

Broj prajmera	Početna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Vezivanje prajmera	Elognacija	Eksenzija	Hlađenje
1-35	95°C:15 min	30	94°C: 1 min	tabela 2	72°C: 1 min	72°C: 7 min	+4°C
36	95°C:15 min	33	96°C: 30 sek	55°C: 30 sek	72°C: 1 min	72°C: 5 min	+4°C
37	95°C:15 min	34	94°C: 1 min	50°C: 2 min	72°C: 3 min	72°C: 7 min	+4°C
38	95°C:15 min	34	94°C: 1 min	54°C: 2 min	72°C: 3min	72°C: 7 min	+4°C
39	95°C:15 min	30	94°C: 30 sek	50°C: 30sek	72°C: 30sek	72°C: 7 min	+4°C
40	95°C:15 min	30	94°C: 1 min	50°C: 1 min	72°C: 1 min	72°C: 10 min	+4°C
41	95°C:15 min	34	94°C: 1 min	58°C: 2 min	72°C: 3 min	72°C: 7 min	+4°C
42	95°C:15 min	34	94°C: 1 min	58°C: 2 min	72°C: 3 min	72°C: 7 min	+4°C
43	95°C:15 min	30	96°C: 1 min	60°C: 1 min	72°C: 1 min	72°C: 5 min	+4°C
44	95°C:15 min	34	94°C: 45 sek	57°C: 45 sek	68°C: 1 min	72°C: 10 min	+4°C
45	95°C:15 min	30	94°C: 45 sek	64°C: 45 sek	72°C: 1 min	72°C: 10 min	+4°C
46-48	95°C:15 min	30	94°C: 30 sek	50°C: 1 min	72°C: 30 sek	72°C: 7 min	+4°C
49	95°C:15 min	30	92°C: 25 sek	64°C: 1 min	74°C: 2 min	72°C: 10 min	+4°C
50	95°C:15 min	30	92°C: 25 sek	64°C: 1 min	72°C: 2 min	72°C: 10 min	+4°C
51	95°C:15 min	30	92°C: 1 min	55°C: 1 min	72°C: 1 min	72°C: 10 min	+4°C
52	95°C:15 min	30	92°C: 25 sek	64°C: 1 min	72°C: 2 min	72°C: 10 min	+4°C
53	95°C:15 min	30	94°C: 30 sek	58°C: 1 min	72°C: 1 min	72°C: 7 min	+4°C
54-60	95°C:15 min	30	94°C: 30 sek	Tabela 2	72°C: 1 min	72°C: 7 min	+4°C
61-63	95°C:15 min	30	94°C: 1 min	37°C: 1 min	72°C: 1 min	72°C: 10 min	+4°C

Tabela 3. Lista gena, prajmera, aniling temperature i veličina fragmenata u baznim parovima koji su korišćeni u PCR reakciji

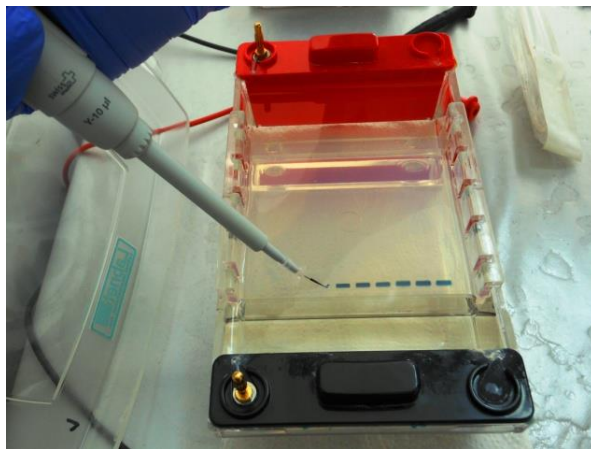
Red. broj	Gen	Rezistencija	Sekvenca prajmera	Aniling temp.	Veličina fragmenta	Referenca
1.	catA1	Hloramfenikol	fw: ggc att tca gtc agt tg rv: cat taa gca ttc tgc cg	56	551	(Kikuvi i sar., 2007)
2.	catA2	Hloramfenikol	fw: tgt taa tca gtt tcc gga gtt cc rv: aca gaa aca ggt aat aat acg cgg	56	372	(Kadlec i sar., 2007)
3.	catA3	Hloramfenikol	fw: aac atg tgg ttt tag ctt aac a rv: gca ata aca gtc tat ccc ctt c	56	473	(Kehrenberg i Schwarz, 2001)
4.	cmlA	Hloramfenikol	fw: ccg cca cgg tgt tgt tat c rv: cac ctt gcc tgc cca tca tta g	60	384	(Kikuvi i sar., 2007)
5.	dfrA1	Trimethoprim	fw: gat att cca tgg agt gcc a rv: acc ctt ttg cca gat ttg	50	414	(Frech i sar., 2003)
6.	dfrA5/14	Trimetoprim	fw: gat tgg ttg cgg tcc a rv: ctc aaa aac aac ttc gaa gg	50	383	(Frech i sar., 2003)
7.	dfrA7/17	Trimethoprim	fw: cag aaa atg gcg taa tcg rv: tca cct tca acc tca acg	50	345	(Frech i sar., 2003)
8.	dfrA12	Trimetoprim	Fw: ttt atc tcg ttg ctg cga tg Rv: taa acg gag gtg ggt gta cgg	60	457	U ovom istraživanju
9.	dfrB1/B2	Trimetoprim	fw: caa agt agc gat gaa gcc a rv: cag gat aaa ttg cga ctg agc	50	205	(Frech i sar., 2003)
10.	floR	Florfenikol	fw: agg gtt gat tcg tca cca rv: cgg tta gac gac tgg cga ct	50	752	(Prüller i sar., 2015)
11.	strA	Streptomycin	fw: tga ctg gtt gcc tgt cag agg c rv: cca gtt gtc ttc ggc gtt agc a	64	646	(Kehrenberg i Schwarz, 2001)
12.	strB	Streptomycin	fw: atc gtc aag gga ttg aaa cc rv: gga tcg tag aac ata ttg gc	56	509	(Kikuvi i sar., 2007)
13.	sul1	Sulfonamidi	fw: cta ggc atg atc taa ccc tcg gtc t rv: atg gtg acg gtg ttc ggc att ctg a	55	840	(Prüller i sar., 2015)
14.	sul2	Sulfonamidi	fw: aca gtt tct ccg atg gag gcc g rv: ctc gtg tgt gcg gat gaa gtc a	55	704	(Kehrenberg i Schwarz, 2001)
15.	sul3	Sulfonamidi	fw: gag caa gat ttt tgg aat cg rv: cat ctg cag cta acc tag ggc ttt gga	51	789	(Perreten and Boerlin, 2003)
16.	tetA	Tetraciklin	fw: gct aca tcc tgc ttg cct tc rv: cat aga tcg ccg tga aga gg	55	210	(Ng et al., 2001)
17.	tetB	Tetraciklin	fw: ttg gtt agg ggc aag ttt tg rv: gta atg ggc caa taa cac cg	55	659	(Ng et al., 2001)
18.	tetC	Tetraciklin	fw: ctt gag agc ctt caa ccc ag rv: atg gtc gtc atc tac ctg cc	55	888	(Ng et al., 2001)
19.	tetD	Tetraciklin	fw: aaa cca tta cgg cat tct gc rv: gac cgg ata cac cat cca tc	55	Varijab.	(Ng et al., 2001)
20.	tetE	Tetraciklin	fw: aaa cca cat cct cca tac gc rv: aaa tag gcc aca acc gtc ag	55	Varijab.	(Ng et al., 2001)
21.	tetG	Tetraciklin	fw: cag ctt tcg gat tet tac gg rv: gat tgg tga ggc tcg tta gc	55	Varijab.	(Ng et al., 2001)
22.	tetH	Tetraciklin	fw: cct gaa aac caa act gcc tc rv: aca gac cat ccc aat aag cg	55	Varijab.	(Kehrenberg i sar., 1998)
23.	tetM	Tetraciklin	fw: gtg gac aaa ggt aca acg ag rv: cgg taa agt tcg tca cac ac	55	406	(Ng et al., 2001)
24.	tetO	Tetraciklini	fw: aac tta ggc att ctg gct cac rv: tcc cac tgt tcc ata tcg tca	55	515	(Ng et al., 2001)
25.	Int1	Integraza 1	fw: gcc ttg ctg ttc ttc tac rv: gat gcc tgc ttg ttc tac	55	558	(Guerra i sar., 2001)
26.	5'3'CS	Integron 1	fw: ggc atc caa gca gca ag rv: aag cag act tga cct ga	55	Varjab.	(Levesque i sar., 1995)
27.	Int2	Integraza 2	fw: cac gga tat gcg aca aaa agg t rv: gta gca aac gag tga cga aat g	62	788	(Saenz i sar., 2004)
28.	Hep74 Hep51	Integron 2	fw: cgg gat ccc gga cgg cat gca cga ttt gta rv: gat gcc atc gca agt acg ag	60	Varijab.	(White i sar., 2001)
29.	aadA1	Streptomycin	fw: cga ctc aac tat cag agg ta rv: ctt ttg tca gca aga tag cc	55	384	(Antunes i sar., 2004)
30.	aadA2	Streptomycin	fw: cgg tga cca tcg aaa ttt cg rv: cta tag gcg gga gcg tct cgc	55	249	(Faldynova i sar., 2003)
31.	aac(3)-I	Gentamicin	fw: ggg cat cat tcg cac atg tag gc rv: cat cac ttc ttc ccg tat gcc c	64	429	(Jakobsen et al., 2008)
32.	aac(3)-II	Gentamicin	fw: tga aac gct gac gga gcc tc rv: gtc gaa cag gta gca ctg ag	58	369	(Jakobsen et al., 2008)

33.	aac(3)-III	Gentamicin	fw: gtg cat cgc agc gca aac ccc rv: caa gcc act gca cgg caa acc g	64	436	(Jakobsen et al., 2008)
34.	aac(3)-IV	Gentamicin	fw: gtg tgc tgc tgg tcc aca gc rv: agt tga ccc agg gct gtc gc	58	628	(Jakobsen et al., 2008)
35.	ant(2 ['])-I	Gentamicin	fw: ggg cgc gtc atg gag gag tt rv: tat cgc gac ctg aaa gcg gc	58	329	(Jakobsen et al., 2008)
36.	armA	Aminoglikozidi	fw: att ctg cct atc cta att gg rv: acc tat act tta tgc tgc tc	55	315	(Doi i Arakawa, 2007)
37.	qnrA	PMQR* gen	fw: tca gca aga gga ttt ctc rv: ggc agc act atg act ccc a	50	591	(Kehrenberg i sar., 2006)
38.	qnrB	PMQR gen	fw: tgc gct gtc agt tct atg atc g rv: tcc atg agc aac gat gcc t	54	456	(Kehrenberg i sar., 2006)
39.	qnrC	PMQR gen	fw: ggg ttg tac att tat tga atc rv: tcc act tta cga ggt tct	50	447	(Wang i sar., 2009)
40.	qnrD	PMQR gen	fw: cga gat caa ttt acg ggg aat a rv: aac aag ctg aag cgc ctg	55	580	(Cavaco i sar., 2009)
41.	qnrS	PMQR gen	fw: tga tct cac ctt cac cgc ttg rv: gaa tca gtt ctt gct gcc agg	58	566	(Kehrenberg i sar., 2006)
42.	aac 6'-lb- cr	PMQR gen	fw: gat ctg ata tgc tgc agt ggt gg rv: gaa cca tgt aca cgg ctg gac	58	435	(Kehrenberg i sar., 2007)
43.	qepA	PMQR gen	fw: gca ggt cca gca cgc ggt ag rv: ctt cct gcc cga gta tgc tg	60	199	(Yamane i sar., 2007)
44.	oqxA	PMQR gen	fw: ctc ggc gcg atg atg ct rv: cca ctc ttc acg gga gac ga	57	412	(Hong i sar., 2009)
45.	oqxB	PMQR gen	fw: ttc tcc ccc ggc ggg aag tac rv: ctc ggc cat ttt ggc gcg ta	64	412	(Hong i sar., 2009)
46.	gyrA	<i>E. coli</i>	fw: tac acc ggt caa cat tga gg rv: tta atg att gcc gcc gtc gg	64	648	(Oram i Fisher, 1991)
47.	gyrB	<i>E. coli</i>	fw: ctc ctc cca gac caa aga ca rv: tca cga cgg ata cca cag cc	64	447	(Vila i sar., 1994)
48.	parC	<i>E. coli</i>	fw: aaa cct gtt cag cgc cgc att rv: gtg gtg cgg tta agc aaa	55	395	(Vila i sar., 1996)
49.	parE	<i>E. coli</i>	fw: ctg aac tgc tgg cgg aga tg rv: cgc gtg gca gtg cga cgt aa	64	483	(Ruiz i sar., 1997)
50.	bla _{TEM}	ESBL	fw: gtg cgg tat tat ccc gtg tt rv: aac ttt atc cgc ctc cat cc	58	416	(Rodriguez-Villalobos i sar., 2006)
51.	bla _{CTX-M}	ESBL	fw: atg tgc agy acc agt aar gtk atg gc rw: tgg gtr aar tar gts acc aga ays agc gg	55	592	(Dierikx i sar., 2012)
52.	bla _{CTX-M-1}	ESBL	fw: agt tca cgc tga tgg cga cg rw: aac cca gga agc agg cag tcc	62	676	(Bogaerts i sar., 2007)
53.	bla _{CTX-M 8-25}	ESBL	fw: cgc ttt gcc atg tgc agc acc rw: gct cag tac gat cga gcc	55	307	(Pitout i sar., 2007)
54.	bla _{OXA-1}	ESBL	fw: atg aaa aac aca ata cat atc aac ttc gc rw: gtg tgt tta gaa tgg tga tgc cat t	55	820	(Dierikx i sar., 2012)
55.	bla _{OXA-2}	ESBL	fw: acg ata gtt gtg gca gac gaa c rw: atz ctg ttt ggc gta ter ata ttc	55	601	(Dierikx i sar., 2012)
56.	bla _{SHV}	ESBL	fw: tta tct ccc tgt tag cca cc rw: gat ttg ctg att tgc ctc gg	55	796	(Dierikx i sar., 2012)
57.	bla _{CMY}	ESBL	fw: atg atg aaa aaa tgc tta tgc tgc rv: gct ttt caa gaa tgc gcc agg	58	1138	(Pitout i sar., 2007)
58.	ChuA.1 ChuA.2	Philogenet. tipizacija	fw: gac gaa cca acg gtc agg at rv: tgc cgc cag tac caa aga ca	55	279	(Clermont i sar, 2000)
59.	YjaA.1 Yj1A.2	Philogenet. tipizacija	fw: tga agt gtc agg aga cgc tg rv: atg gag aat gcg ttc ctc aac	55	211	(Clermont i sar, 2000)
60.	TspE4C2.1 TspE4C2.2.	Philogenet. tipizacija	fw: gag taa tgt cgg ggc att ca rv: cgc gcc aac aaa gta tta cg	55	152	(Clermont i sar, 2000)
61.	1254	RAPD	fw: ccg cag cca a	37	-	(Pacheco et al., 1997)
62.	1290	RAPD	fw: ccg cag cca a	37	-	(Pacheco et al., 1997)
63.	1252	RAPD	fw: gcg gaa ata g	37	-	(Pacheco et al., 1997)

Za potrebe metode sekvenciranja, koja je izvedena uslužno u laboratoriji GATC Biotech, u Kelnu (Nemačka), dobijeni PCR produkti su prečišćeni komercijalnim setom za purifikaciju PCR produkata (PEQLAB, Wilmington, SAD). Za analizu poređenja u BLAST-u dobijene sekvence obrađene su do konsenzus sekvence u programu BioEdit.

3. Elektroforeza

Elektroforeza je izvedena na aparatu Labnet (Enduro, Horizontal gel System, Woodbridge, NJ, SAD) u 1 x TAE puferu (TRIS-EDTA pufer) koji je napravljen od 50 x koncentrovanog TAE pufera (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija), u koncentraciji od 0.5%. Gel (2%) je pripremljen od agaroze (Lonza Verviers, Belgija) sa dodatkom 1 μ L etidijum bromida (Serva, Heidelberg, Nemačka). Etidijum bromid je dodavan i u 1 x TAE pufer za elektroforezu u količini od 25 μ L na 500 mL 1 x TAE pufera. Za vizuelizaciju PCR produkata na gelu korišćen je rastvor boja GelPilot Loading dye (Qiagen, Hilden, Nemačka), dok je za određivanje veličine fragmenata korišćen marker GelPilot Plus Ladder (Qiagen, Hilden, Nemačka) od 1000 bp i marker GelPilot Plus Ladder (Qiagen, Hilden, Nemačka) od 3000 bp. Rezultati su očitavani na UV transluminatoru proizvođača UVP, Upland, SAD.



Slika 17. Nanošenje uzoraka na gel (2%) u bazen elektroforeze

4.2.5. Određivanje filogenetske pripadnosti izolata *E. coli* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Primenom PCR metode utvrđena je filogenetska pripadnost izolata *E. coli* prema određenim filogenetskim grupama A, B₁, B₂ i D, primenom tri prajmera (*YjaA*, *TspE* i *ChuA*) prema protokolu prikazanom u Tabeli 2. Filogenetskoj grupi A (komensali) pripadaju izolati *E. coli* pozitivni na *Yja* gen, dok filogenetskoj grupi B₁ pripadaju izolati pozitivni na *Tsp* gen. Grupi D (u maloj meri ekstraintestinalni) pripadaju izolati *E. coli* pozitivni na *ChuA* gen ili pozitivni na *ChuA* i *Tsp* gene, dok grupi B₂ (ekstraintestinalni) pripadaju izolati pozitivni na *ChuA* i *Yja* ili pozitivni na sva tri gena.

4.2.6. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata *E. coli* metodom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD)

Elektroforeza u pulsnom polju (PFGE) za utvrđivanje genetičke srodnosti izolata, izvedena je u Institutu za javno zdravlje Srbije "Milan Jovanović-Batut", na odseku za mikrobiologiju od prekonocne kulture *E. coli* na hranljivom Trypton soja agaru (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) sa dodatkom 5% defibrinisane ovčije krvi. Korišćen je sistem CHEF DR-III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) sa 1% SeaKem gold agarozom gelom (Lonza, Rockland, ME) i 2.0 L 0,5 x TBE (Tris Borat EDTA pufer) za razdvajanje, prema standardnom laboratorijskom protokolu za jednodnevnu (24-26h) molekularnu subtipizaciju *E. coli* non-O157 STEC, *Salmonella*, *Shigella sonnei* i *Shigella flexneri* (www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigellasalmonella-pfge-protocol-508c.pdf). PFGE metoda je sprovedena tako što su prvo napravljeni agarozni blokovi cele DNK izolata *E. coli*, a zatim je urađena digestija pomoću *XbaI* enzima (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija) i izvedena elektroforeza u trajanju od 18h, konstantne voltaže 6V/cm uz primenu pulsa od 6,76-35,38 s. Za vizuelizaciju, gel je obojen etidijum bromidom (Serva, Heidelberg, Nemačka), a za uočavanje fragmenata korišćen je UV transiluminator (BioRad, ChemiDoc XRS, Francuska). *Salmonella enterica* serotip *Braenderup* H9812 je korišćena kao marker za određivanje veličine fragmenata.

Pored PFGE metode, za utvrđivanje genetičke srodnosti izolata *E. coli*, korišćena je i metoda RAPD. Metoda RAPD je vrsta PCR metode, koja se zasniva na nasumičnom umnožavanju segmenata DNK uz pomoć samo jednog prajmera, koji se veže za dve sekvence na

suprotnim lancima DNK, koje međusobno nisu udaljene više od 2kb, što približno odgovara maksimalnoj veličini PCR fragmenta. Kada su ovi uslovi ispunjeni, može doći do amplifikacije i dobija se RAPD profil uzorka, koji se obično sastoji od 1-20 traka. U ovom istraživanju korišćena su tri različita prajmera (1254, 1252 i 1290) prema protokolu iz Tabele 2.

4.2.7. Utvrđivanje genetičkog sastava integrona metodom sekvenciranja

Utvrđivanje genetičkog sastava integrona sekvenciranjem PCR produkata metodom "primer walking" je izvedeno na Institutu za kvalitet i bezbednost hrane u Hanoveru u Nemačkoj. Za analiziranje sekvenci korišćenjen softverski program DNAMAN verzija 7 (Lynnon Corporation, Kvebek, Kanada)

4.2.8. Eksperiment konjugacije

Pre izvođenja eksperimenta konjugacije urađena je izolacija plazmida izolata *E. coli* donora komercijalnim setom za izolaciju plazmida (Monarch Plasmid Miniprep Kit, BioLabs, Engleska), kako bi se utvrdilo prisustvo plazmidske DNK. Elektroforeza je izvedena na aparatu Labnet (Enduro, Horizontal gel System, Woodbridge, NJ, SAD) na 1% gelu, koji je pripremljen uz pomoć agaroze (Lonza Verviers, Belgija) sa dodatkom 1 μ L etidijum bromida (Serva, Heidelberg, Nemačka). Etidijum bromid je takođe dodavan u 1 x TAE pufer za elektroforezu, koji je napravljen od 50 x koncentrovanog TAE pufera (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija), u koncentraciji od 0.5%.

Eksperiment konjugacije je izveden u Luria Bertani bujonu (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francuska) sa *E. coli* recipijentom HK225 koji je rezistentan na rifampicin i streptomycin. Najpre je određen MIK za ampicilin/tetraciklin i rifampicin kod izolata *E. coli* donora (iz kolekcije izolata koji su u eksperimentu) i recipijenta *E. coli* HK225, kako bi se utvrdila minimalna koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija. Eksperiment konjugacije protiče u tri faze.

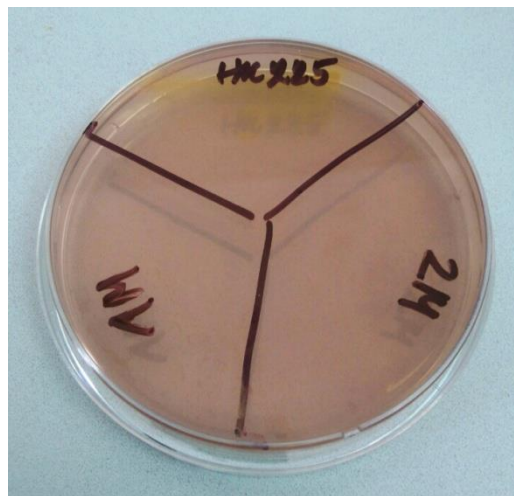
1. Faza – Selekcija na Luria Bertani agaru (LB agar)

Selekcija izolata *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta izvedena je na LB agaru (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francuska), sa dodatkom ampicilina/tetraciklina u koncentraciji 100 mg/L i na LB agaru sa dodatkom rifampicina u koncentraciji 100 mg/L

(Sigma, Aldrich, Munich, Germany). Za selekciju izolata *E. coli* donora, rezistentnih na ampicilin, korišćen je ampicilin, dok je za selekciju izolata osetljivih na ampicilin korišćen tetraciklin (kod izolata koji su rezistentni na tetraciklin). Nakon inkubacije od 24h na 37°C, *E. coli* donori su rasli na LB agaru sa ampicilinom/tetraciklinom, a nisu rasli na LB agaru sa rifampicinom, dok je *E. coli* HK225 recipijent rastao na LB agaru sa rifampicinom, a nije rastao na LB agaru sa ampicilinom/tetraciklinom.



Slika 18. Selekcija *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta na LB agaru sa dodatkom ampicilina



Slika 19. Selekcija *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta na LB agaru sa dodatkom rifampicina

2. Faza - Selekcija u Luria Bertani bujonu (LB bujon)

Selekcija izolata *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta izvedena je njihovim presejavanjem sa LB agara u LB bujon sa dodatkom ampicilina/tetraciklina u koncentraciji 100 mg/L i u LB bujon sa dodatkom rifampicina u koncentraciji 100 mg/L. Nakon inkubacije od 24h na 37°C, *E. coli* donori su rasli u LB bujonu sa ampicilinom/tetraciklinom, a nisu rasli u LB bujonu sa rifampicinom, dok je *E. coli* HK225 recipijent rastao u LB bujonu sa rifampicinom, a nije rastao u LB bujonu sa ampicilinom/tetraciklinom.



Slika 20. Selekcija *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta u LB bujonu

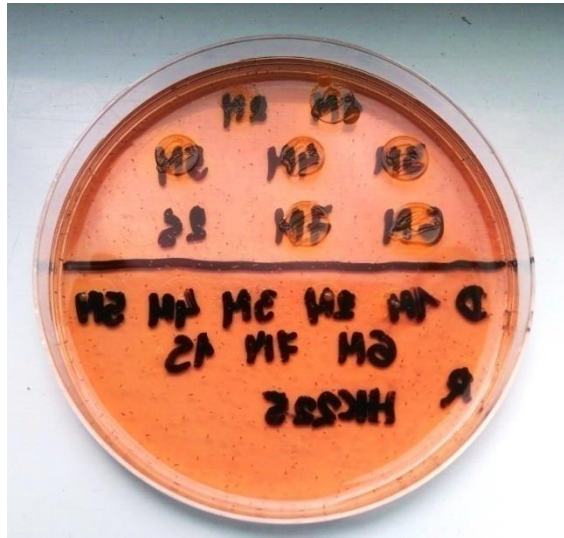
3. Faza - Spajanje izolata donora i recipijenta

U plastične mikrotube zapremine 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), dodato je po 2 mL suspenzije *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta. Centrifugiranjem na 13500 rpm bakterije su oborene na dno, a supernatant je odliven. Talog bakterija ispran je sa 1 mL LB bujona bez antibiotika. Mešanjem na vorteksu talog je rastvoren. Centrifugiranjem na 13500 rpm bakterije su ponovo oborene na dno, a supernatant odliven. Talog bakterija *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta rastvoren je sa po 200 µL LB bujona bez antibiotika.

U novim plastičnim mikrotubama zapremine 2 mL, pomešano je 180 µL *E. coli* HK225 recipijenta i 20 µL *E. coli* donora, tako da je dobijen odnos 1:10 u korist recipijenta. Dobijeni konjugati odloženi su na električnu mešalicu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) 8h na 37°C. Nakon inkubacije, konjugati su nanošeni na jednom delu, unapred pripremljenog i obeleženog

LB agara sa dodatkom ampicilna/tetraciklina u koncentraciji 100 mg/L i rifampicina u koncentraciji 100 mg/L. U drugom delu LB agara, nanošene su suspenzije *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta. Ovakav LB agar je inkubiran 24h na 37°C.

Posle inkubacije na LB agaru, izrasle su kolonije dobijenog transkonjuganta, dok je rast *E. coli* donora i *E. coli* HK225 recipijenta inhibiran (Slika 21).



Slika 21. Kolonije transkonjuganata na LB agaru nakon 24h inkubacije, na 37°C

Elektroforezom u pulsnom polju (PFGE) determinisan je genetički profil dobijenih transkonjuganata, koji treba da bude identičan ili blizak recipijentu *E. coli* HK225, a potpuno različit u odnosu na *E. coli* donora. Kao marker za određivanje veličine PFGE fragmenata korišćena je *Salmonella enterica* serotip *Braenderup* H9812. Prisustvo gena rezistencije na transkonjugantima potvrđeno je PCR metodom.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Utvrđivanje multirezistencije izolata *E. coli* primenom disk difuzione metode na agaru

Tokom 2013. i 2014. godine od ukupno 104 uzoraka mleka krava sa kliničkim mastitisom, *E. coli* je izolovana iz devet uzoraka. Primenom disk difuzione metode utvrđeno je da su sedam izolata *E. coli* bili multirezistentni, odnosno imali rezistenciju na tri i više antibiotika, dok su dva izolata imala rezistenciju na manje od tri antibiotika. Tokom 2013. i 2014. godine od 283 uzoraka bolesne odlučene prasadi i tovljenika 39 uzoraka bili su rektalni brisevi od životinja koje su imale dijareju. Iz svih briseva izolovana je *E. coli*, a primenom disk difuzione metode multirezistencija ustanovljena je kod 15 izolata *E. coli*, dok su ostali izolati bili rezistentni na manje od tri antibiotika.

Ukupno 22 izolata *E. coli*, poreklom sa 22 farme muznih krava i svinja (jedan izolat-jedna farma), pokazali su multirezistenciju prema antibioticima koji su korišćeni u disk difuzionoj metodi na agaru, (Tabela 4).

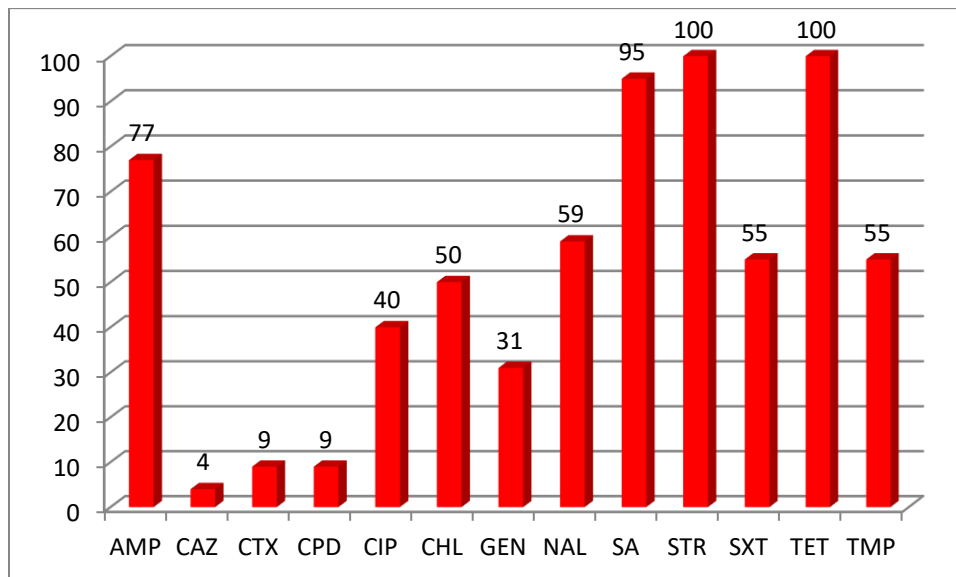
Tabela 4. Multirezistencija izolata *E. coli*, utvrđena disk difuzionom metodom na agaru

Redni broj	Oznaka izolata	Poreklo izolata	Rezistotip
1.	1M-13	Mleko krave	AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
2.	2M-13	Mleko krave	AMP, CIP, CHL, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
3.	3M-13	Mleko krave	AMP, CIP, NAL, SA, STR, TET
4.	4M-13	Mleko krave	AMP, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
5.	5M-14	Mleko krave	STR, SA, TET
6.	6M-13	Mleko krave	AMP, SA, STR, SXT, TET, TMP
7.	7M-14	Mleko krave	AMP, CTX, CPD, SA, STR, SXT, TET, TMP
8.	1S-13	Svinja	NAL, SA, STR, TET
9.	2S-13	Svinja	AMP, CIP, NAL, SA, STR, TET
10.	3S-13	Svinja	AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
11.	5S-13	Svinja	AMP, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
12.	6S-13	Svinja	AMP, CIP, CHL, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
13.	7S-13	Svinja	AMP, CAZ, CPD, CTX, CIP, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
14.	8S-13	Svinja	AMP, CHL, SA, STR, TET
15.	9S-13	Svinja	AMP, CHL, SA, STR, TET
16.	10S-13	Svinja	SA, STR, TET
17.	11S-13	Svinja	SA, STR, SXT, TET, TMP
18.	12S-13	Svinja	AMP, CHL, NAL, STR, TET
19.	13S-14	Svinja	CHL, SA, STR, TET
20.	14S-14	Svinja	AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
21.	15S-14	Svinja	AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP
22.	16S-14	Svinja	AMP, CHL, GEN, SA, STR, TET

*AMP-ampicilin, CAZ-ceftazidim, CPD-cefpodoksim, CTX-cefotaksim, CIP-ciprofloksacin, CHL-hloramfenikol, GEN-gentamicin, NAL-nalidiksinska kiselina, SA-sulfonamidi, STR-streptomycin, SXT-trimetoprim/sulfametoksazol, TET-tetraciklin, TMP-trimetoprim

Jedan izolat *E. coli* (7S-13) pokazao je multirezistenciju na 12 antibiotika, četiri izolata *E. coli* (1M-13, 3S-13, 14S-14 i 15S-14) na 10 antibiotika, dok su dva izolata *E. coli* (2M-13 i 6S-13) imala multirezistenciju na devet antibiotika. Dva izolata *E. coli* (4M-13 i 7M-14) imala su multirezistenciju na osam antibiotika, jedan izolat *E. coli* (5S-13) na sedam antibiotika, dok četiri izolata *E. coli* (3M-13, 6M-13, 2S-13 i 16S-14) imala su multirezistenciju na šest antibiotika. Četiri izolata *E. coli* (8S-13, 9S-13, 11S-13 i 12S-13) pokazala su multirezistenciju prema pet antibiotika, a dva (1S-13 i 13S-14) prema četiri antibiotika. Multirezistenciju prema tri antibiotika ispoljila su dva izolata *E. coli* (5M-14 i 10S-13).

Grafikon 1. Prikaz zastupljenosti multiple rezistencije po antibioticima u %



Od ukupno 22 ispitana izolata, jedan izolat *E. coli* (7M-14) je bio rezistentan na cefotaksim i cefpodoksim, i jedan (7M-13) na ceftazidim, cefotaksim i cefpodoksim. Svi izolati *E. coli* bili su rezistentni na streptomycin i tetraciklin, a 17 izolata je pokazalo rezistenciju na ampicilin (1M-13, 2M-13, 3M-13, 4M-13, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 3S-13, 5S-13, 6S-13, 7S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14). Devet izolata ispoljilo je rezistenciju na ciprofloksacin (1M-13, 2M-13, 3M-13, 2S-13, 3S-13, 6S-13, 7S-13, 14S-14 i 15S-14), a na hloramfenikol 11 izolata (1M-13, 2M-13, 3S-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 13S-14, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), dok je rezistenciju na nalidiksinsku kiselinu pokazalo 13 izolata (1M-13, 2M-

13, 3M-13, 4M-13, 1S-13, 2S-13, 3S-13, 5S-13, 6S-13, 7S-13, 12S-13, 14S-14 i 15S-14). Rezistenciju na gentamicin je imalo sedam izolata *E. coli* (1M-13, 4M-13, 3S-13, 7S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), a samo jedan izolat (12S-13) nije bio rezistentan na sulfonamide. Po 12 izolata bilo je rezistentno na trimetoprim i trimetoprim/sulfametoksazol (1M-13, 2M-13, 3M-13, 6M-13, 7M-14, 3S-13, 5S-13, 6S-13, 7S-13, 11S-13, 14S-14 i 15S-14), (Grafikon 1).

Primenom fenotipskog testa za sinergističko deleovanje antibiotika cefotaksim i cefotaksim/klavulonska kiselina, kao i ceftazidim i ceftazidim/klavulonska kiselina, disk difuzionom metodom, utvrđeno je da dva izolata *E. coli* 7M-14, poreklom iz mleka krava, sa rezistencijom prema cefotaksimu i cefpodoksimu, i 7S-13 poreklom od svinja, sa rezistencijom prema ceftazidimu, cefotaksimu i cefpodoksimu, imaju sposobnost produkcije enzima beta-laktamaze sa proširenim spektrom, odnosno pripadaju grupi ESBL producera, (Slika 22).



Slika 22. Test sinergizma CTX+CTX/Klavulonska kiselina kod izolata *E. coli* 7M-14 poreklom iz mleka krave

5.2. Utvrđivanje multirezistencije izolata *E. coli* primenom mikrodilucione metode u bujonu

Mikrodilucionom metodom u bujonu utvrđena je minimalna koncentracija antibiotika koja zaustavlja rast kod 22 izolata *E. coli* (sedam izolata poreklom iz mleka krava i 15 izolata poreklom od svinja) koji su uključeni u istraživanje. Dobijene vrednosti MIK-a izražene su u koncentraciji mg/L za svaki antibiotik i kretale su se u opsegu od >512 mg/L do 2 mg/L kod AMP, od >128mg/L do 4 mg/L kod AMX, od 16 mg/L do 2 mg/L kod AMC, od 32 mg/L do 0,125 mg/L kod CAZ, od >32 mg/L do 0,031 mg/L kod CTX, od >128 mg/L do 8 mg/L kod CIP, od 256 mg/L do 4 mg/L kod CHL, od 512 mg/L do 4 mg/L kod FLO, 64 mg/L do 0,5 mg/L kod GEN, >1024 mg/L do 2 mg/L kod NAL, od >1024 mg/L do 8 mg/L kod SA, od >512 mg/L do 32 mg/L kod STR, od 512 mg/L do 2 mg/L kod TET i od >512 mg/L do 0,25 mg/L kod TMP, (Tabela 5).

Tabela 5. Multirezistencija izolata *E. coli*, utvrđena mikrodilucionom metodom u bujonu

Oznaka izolata	Antibiotici													
	AMP mg/L	AMX mg/L	AMC mg/L	CAZ mg/L	CTX mg/L	CIP mg/L	CHL mg/L	FLO mg/L	GEN mg/L	NAL mg/L	SA mg/L	STR mg/L	TET mg/L	TMP mg/L
1M-13	512	>128	8	0,25	0,125	32	128	512	64	>1024	>1024	256	512	>512
2M-13	512	>128	8	0,5	0,25	16	128	512	1	>1024	>1024	>512	2	>512
3M-13	512	>128	8	0,5	1	32	8	8	1	>1024	>1024	>512	256	1
4M-13	512	>128	8	0,25	0,125	0,125	8	4	64	256	>1024	64	128	512
5M-14	8	4	2	0,5	0,125	0,015	4	8	1	4	512	64	512	0,25
6M-13	512	>128	8	0,125	0,062	0,007	2	8	0,5	2	>1024	256	64	512
7M-14	>512	>128	16	0,125	>32	0,015	4	8	0,5	8	>1024	256	64	512
1S-13	2	>128	4	0,125	0,062	0,25	4	4	1	128	>1024	64	128	0,25
2S-13	>512	>128	4	0,125	0,125	16	4	4	1	>1024	>1024	512	128	0,25
3S-13	512	>128	4	0,125	0,125	4	128	4	64	>1024	>1024	256	256	512
5S-13	512	>128	8	0,25	0,25	0,062	4	8	1	64	>1024	128	128	512
6S-13	512	>128	8	0,5	0,125	8	64	512	1	>1024	>1024	128	256	512
7S-13	512	>128	8	32	>32	>128	4	4	64	>1024	>1024	64	256	>512
8S-13	512	>128	4	0,125	0,25	0,004	64	256	1	8	>1024	32	128	0,25
9S-13	512	>128	8	0,5	0,125	0,007	128	256	1	4	>1024	64	256	0,25
10S-13	4	>128	8	0,25	0,031	0,007	4	4	2	4	>1024	128	128	0,25
11S-13	2	>128	8	0,25	0,031	0,007	4	4	2	4	>1024	128	128	>512
12S-13	512	>128	8	0,5	0,125	0,5	256	512	1	256	8	>512	128	0,25
13S-14	4	>128	8	0,5	0,031	0,007	128	4	0,5	4	>1024	64	64	0,25
14S-14	512	>128	8	0,5	0,062	32	256	8	64	>1024	>1024	512	64	>512
15S-14	512	>128	4	0,5	0,062	16	64	4	64	>1024	>1024	512	256	>512
16S-14	>512	>128	8	0,5	0,062	0,125	64	8	32	16	1024	128	512	0,25

*AMP-ampicilin, AMX-amoksicilin, AMC-amoksicilin/klavulonska kiselina, CAZ-ceftazidim, CTX-cefotaksim, CPD-cefpodoksim, CIP-ciprofloksacin, CHL-hloramfenikol, FLO-florfenikol, GEN-gentamicin, NAL-nalidiksinska kiselina, SA-sulfametoksazol, STR-streptomycin, TET-tetraciklin, TMP-trimetoprim

Pored antibiotika preporučenih od strane CLSI, utvrđena je i rezistencija na amoksicilin i florfenikol mikrodilucionom metodom u bujonu. Rezistenciju na amoksicilin je imao 21 izolat *E. coli*, a samo jedan izolat poreklom iz mleka krave (5M-14) je bio osetljiv. Rezistenciju na folorfenikol je imalo šest izolata *E. coli*, dva izolata poreklom iz mleka krava (1M-13, 2M-13) i četiri izolata poreklom od svinja (6S-13, 8S-13, 9S-13 i 12S-13). Kao predstavnik sulfonamida za mikrodilucionu metodu u bujonu je korišćen sulfametoksazol. Rezistenciju na sulfametoksazol ispoljili su svi izolati osim jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje (12S-13).

5.3. Utvrđivanje filogenetske pripadnosti multirezistentnih izolata *E. coli* metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

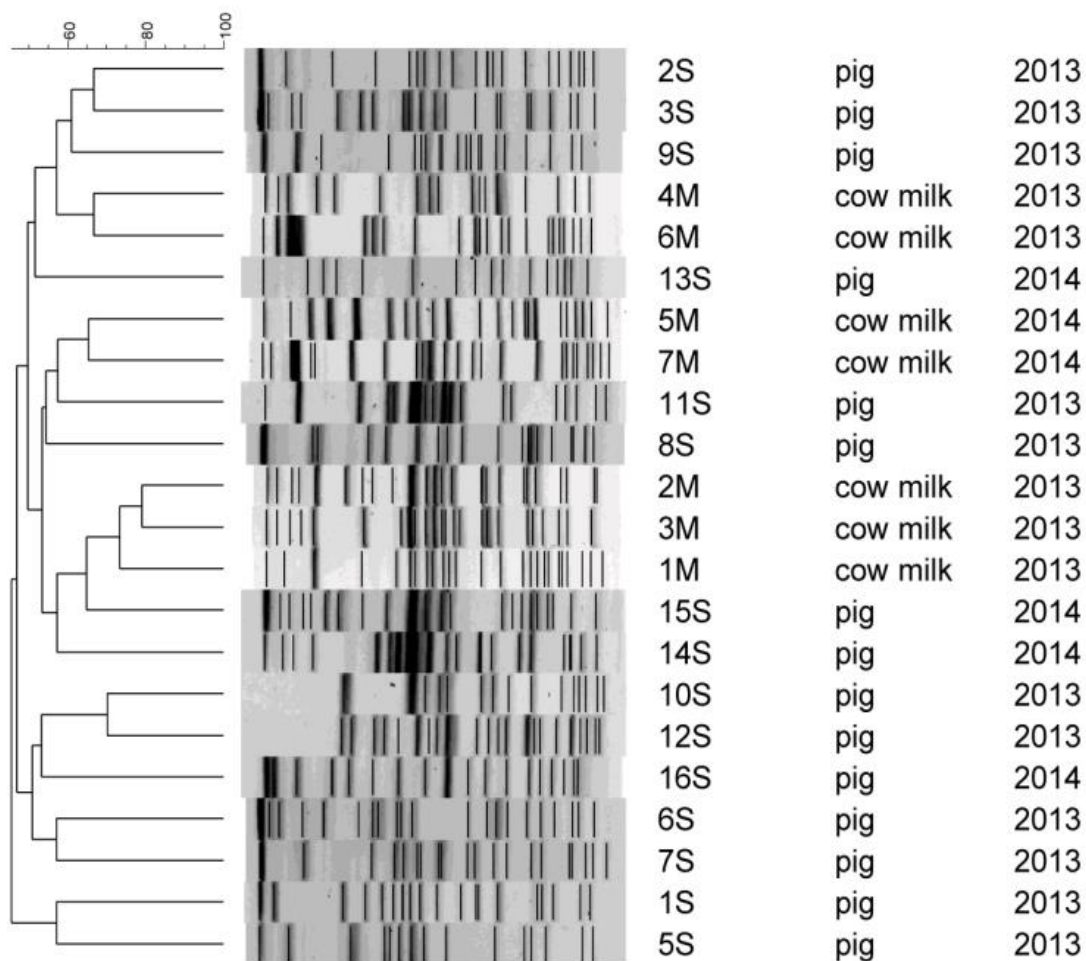
Od ukupno sedam ispitanih multirezistentnih izolata *E. coli*, poreklom od muznih krava, šest izolata je pripadalo komensalnoj filogenetskoj grupi A, a jedan izolat filogenetskoj grupi B₁. Od ukupno 15 ispitanih izolata *E. coli*, poreklom od svinja, 11 izolata pripadalo je filogenetskoj grupi A, dok su po dva izolata pripadala grupama B₁ i D. Ni jedan izolat *E. coli* od muznih krava i svinja nije pripadao filogenetskoj grupi B₂, (Tabela 6).

Tabela 6. Filogenetska pripadnost izolata *E. coli*

Redni broj	Oznaka izolata	Poreklo izolata	Filogenetska grupa
1.	1M-13	Mleko krave	A
2.	2M-13	Mleko krave	A
3.	3M-13	Mleko krave	A
4.	4M-13	Mleko krave	A
5.	5M-14	Mleko krave	A
6.	6M-13	Mleko krave	A
7.	7M-14	Mleko krave	B ₁
8.	1S-13	Svinja	D
9.	2S-13	Svinja	B ₁
10.	3S-13	Svinja	A
11.	5S-13	Svinja	A
12.	6S-13	Svinja	D
13.	7S-13	Svinja	A
14.	8S-13	Svinja	A
15.	9S-13	Svinja	A
16.	10S-13	Svinja	A
17.	11S-13	Svinja	A
18.	12S-13	Svinja	A
19.	13S-14	Svinja	A
20.	14S-14	Svinja	B ₁
21.	15S-14	Svinja	A
22.	16S-14	Svinja	A

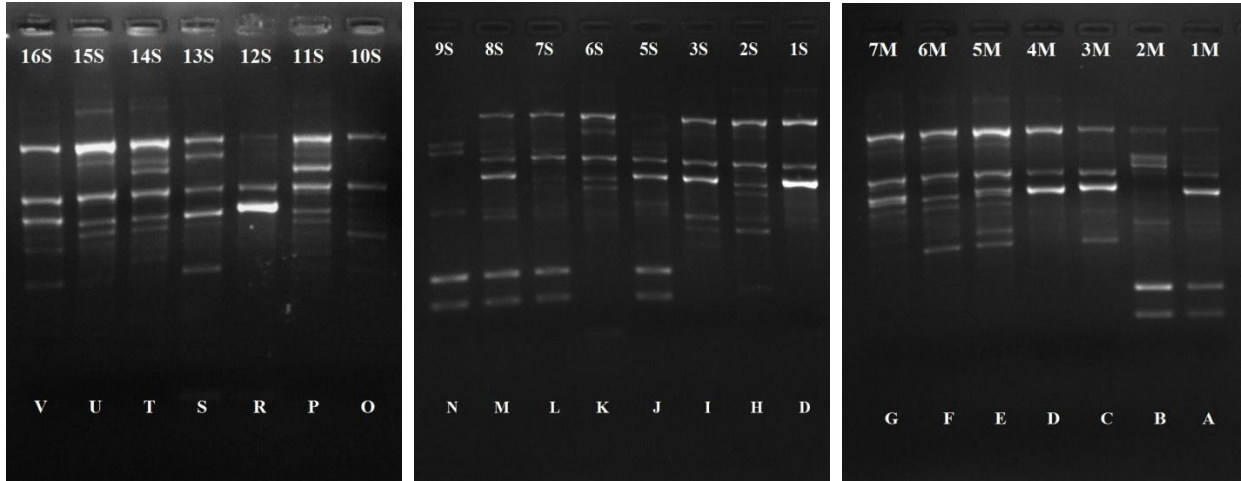
5.4. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata *E. coli* metodom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD)

Na osnovu dobijenih PFGE fragmenata napravljen je dendogram za utvrđivanje genetičke srodnosti izolata (Slika 23). Dendogram je izrađen u softver programu Bio Numerics, verzija 7.2, Applied Maths (www.applied-maths.com/bionumerics). Svi izolati *E. coli* uključeni u istraživanje pokazali su različite PFGE fragmente posle restrikcije sa *XbaI* enzimom.

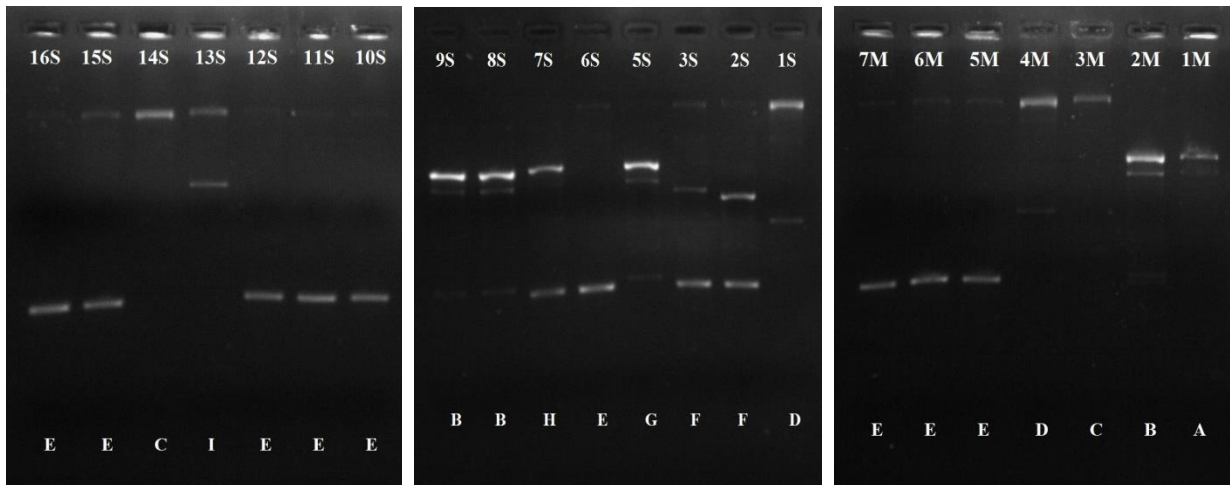


Slika 23. PFGE fragmeti izolata *E. coli* na dendogramu

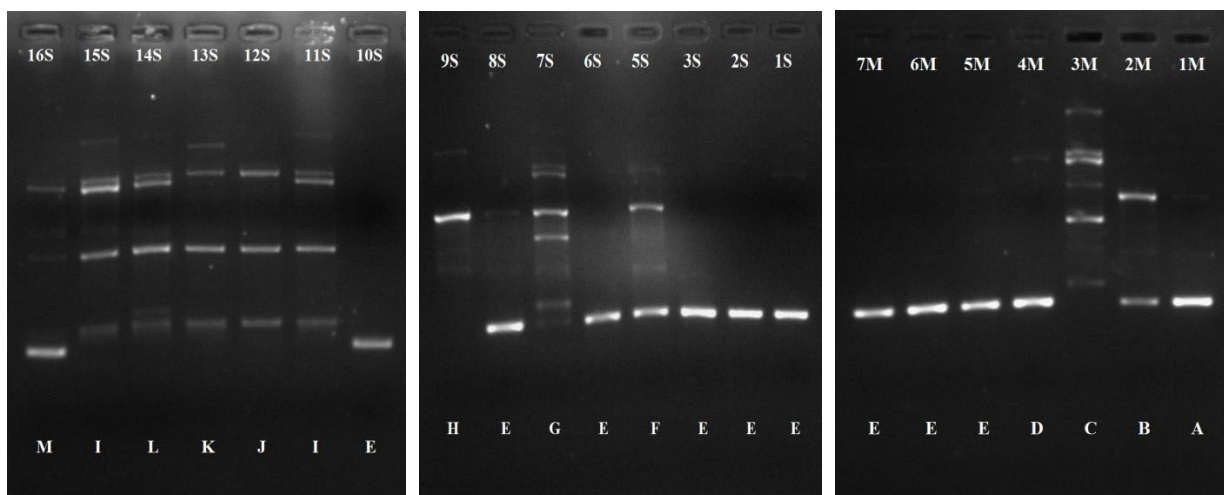
Različiti PCR fragmenti dobijeni su i RAPD metodom, kod svih izolata *E. coli* poreklom od svinja i iz mleka krava, uključenih u istraživanje (Slike 24, 25 i 26). Detekovani, različiti RAPD profili sa tri prajmera (1254, 1252 i 1290) prikazani su u Tabeli 7.



Slika 24. PCR fragmenti kod RAPD metode sa prajmerom 1254



Slika 25. PCR fragmenti kod RAPD metode sa prajmerom 1252



Slika 26. PCR fragmenti kod RAPD metode sa prajmerom 1290

Tabela 7. Različiti RAPD profili svih izolata

Redni broj	Oznaka izolata	Poreklo izolata	RAPD profil
1.	1M-13	Mleko krave	AAA
2.	2M-13	Mleko krave	BBB
3.	3M-13	Mleko krave	CCC
4.	4M-13	Mleko krave	DDD
5.	5M-14	Mleko krave	EEE
6.	6M-13	Mleko krave	FEF
7.	7M-14	Mleko krave	GEF
8.	1S-13	Svinja	DDE
9.	2S-13	Svinja	HFE
10.	3S-13	Svinja	IFE
11.	5S-13	Svinja	JGF
12.	6S-13	Svinja	KEE
13.	7S-13	Svinja	LGH
14.	8S-13	Svinja	MBE
15.	9S-13	Svinja	NBH
16.	10S-13	Svinja	OEE
17.	11S-13	Svinja	PEI
18.	12S-13	Svinja	REJ
19.	13S-14	Svinja	SIK
20.	14S-14	Svinja	TCL
21.	15S-14	Svinja	UEI
22.	16S-14	Svinja	VEM

5.5. Utvrđivanje prisustva gena *E. coli* koji kodiraju rezistenciju na određene klase antibiotika metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Metodom PCR detektovani su geni koji kodiraju rezistenciju kod svih klasa antibiotika preporučenih od strane CLSI za kontrolu antimikrobne rezistencije kod familije *Enterobacteriaceae*, (Tabela 8).

Tabela 8. Genotipizacija rezistencije izolata *E. coli* metodom PCR

Redni broj	Oznaka izolata	Poreklo izolata	Detektovani geni
1.	1M-13	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cmlA</i> , <i>floR</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrA12</i>
2.	2M-13	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA1</i> ,
3.	3M-13	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>aac6'Ib-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> ,
4.	4M-13	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA5-14</i>
5.	5M-14	Mleko krave	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i>
6.	6M-13	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M8-25}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA1</i>
7.	7M-14	Mleko krave	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA5-14</i>
8.	1S-13	Svinja	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>tetB</i>
9.	2S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i>
10.	3S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrA7-17</i>
11.	5S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA1</i>
12.	6S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrA5/14</i>
13.	7S-13	Svinja	<i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac6'Ib-cr</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrA7-17</i>
14.	8S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA1</i> , <i>tetB</i>
15.	9S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i>
16.	10S-13	Svinja	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i> , <i>tetB</i>
17.	11S-13	Svinja	<i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA1</i>
18.	12S-13	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> ,
19.	13S-14	Svinja	<i>cat1</i> , <i>sul1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetA</i>
20.	14S-14	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA5/14</i>
21.	15S-14	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>cat1</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrA5/14</i>
22.	16S-14	Svinja	<i>bla_{TEM}</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>tetB</i>

Rezistencija na beta-laktame

Kod 16 izolata *E. coli* koji su rezistentni na ampicilin (1M-13, 2M-13, 3M-13, 4M-13, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 3S-13, 5S-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), metodom PCR i sekvenciranjem pronađen je gen *bla_{TEM-1}*. Metodom PCR kod dva izolata *E. coli* (7M-14 i 7S-13), sa pozitivnim fenotipskim testom za sinergizam antibiotika (cefalosporini sa i bez klavulonske kiseline), detektovan je gen *bla_{CTX-M-1}*. Dva izolata (3M-13 i 6M-13), poreklom iz mleka krava imali su gene *bla_{OXA}* i *bla_{CTX-M8-25}*, ali nije utvrđena rezistencija na cefalosporine

(CTX i CAZ) što znači da geni *bla_{OXA}* i *bla_{CTX-M8-25}* nisu eksprimirani iako su bili identifikovani PCR metodom, (Tabela 8).

Rezistencija na aminoglikozide

Rezistencija na gentamicin je nađena kod šest izolata (1M-13, 4M-13, 3S-13, 7S-13, 14S-14 i 15S-14). Kod svih šest izolata PCR metodom detektovan je gen koji kodira enzim aminoglikozid acetyltransferazu, odnosno gen *aac(3)-II*. Rezistencija na streptomycin kodirana je *strA* i *strB* genima kod 17 izolata (2M-13, 3M-13, 4M-13, 4M-13, 5M-14, 6M-13, 7M-14, 1S-13, 2S-13, 3S-13, 5S-13, 6S-13, 7S-13, 9S-13, 11S-13, 12S-13, 14S-14 i 15S-14). Takođe, rezistencija na streptomycin i spektinomycin kodirana je i od strane *aadA1* i *aadA2* gena. Izolati *E. coli* koji imaju oba ova gena su 1M-13, 2M-13, 5S-13, 10S-13 i 16S-14, dok izolati 4M-13, 6M-13, 1S-13, 8S-13 i 11S-13 imaju *aadA1* gen. Gen *aadA2* ima samo jedan izolat *E. coli* i to 13S-14, (Tabela 8).

Rezistencija na sulfonamide

Rezistencija na sulfonamide kodirana je od strane *sul1* gena kod pet izolata i to kod 9S-13, 10S-13, 13S-14, 15S-14 i 16S-14, zatim preko *sul2* gena kod šest izolata (2M-13, 7M-14, 2S-13, 6S-13, 7S-13 i 8S-13). Gen *sul3* metodom PCR nađen je u kombinaciji sa *sul2* genom kod dva izolata (1M-13 i 3S-13), dok su geni *sul1* i *sul2* u kombinaciji nađeni kod šest izolata (3M-13, 4M-13, 6M-13, 5S-13, 11S-13 i 14S-14), (Tabela 8).

Rezistencija na hloramfenikole

Rezistencija na hloramfenikol je utvrđena kod 11 izolata (1M-13, 2M-13, 3S-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 13S-14, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), dok je kombinovana rezistencija na hloramfenikol i florfenikol nađena kod pet izolata (1M-13, 2M-13, 6S-13, 8S-13 i 12S-13). Rezistencija izolata *E. coli* na hloramfenikol je kodirana od strane *cat1* gena kod četiri izolata (3S-13, 13S-14, 14S-14 i 15S-14), dok je *cmlA* gen, koji kodira mehanizam efluksa metodom PCR nađen samo kod jednog izolata (1M-13). Kod izolata 1M-13 nađena su oba gena *cmlA* i *floR*. Kod pet izolata *E. coli* (2M-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13 i 12S-13) nađen je *floR* gen koji kodira rezistenciju i na hloramfenikol i na florfenikol, (Tabela 8).

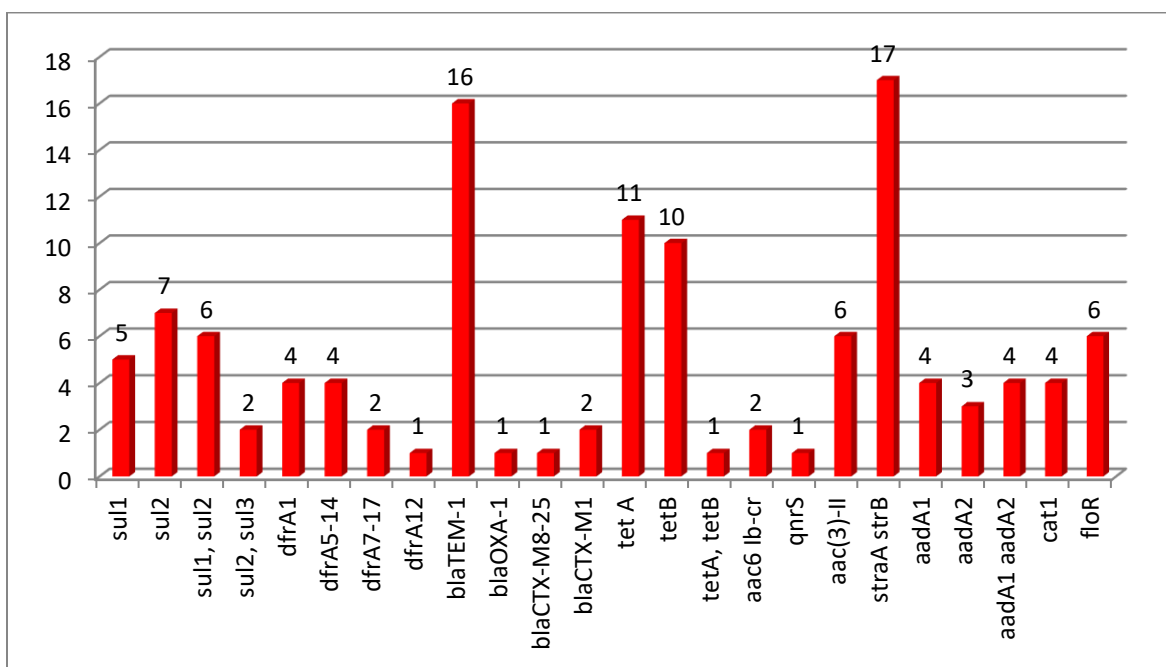
Rezistencija na trimetoprim

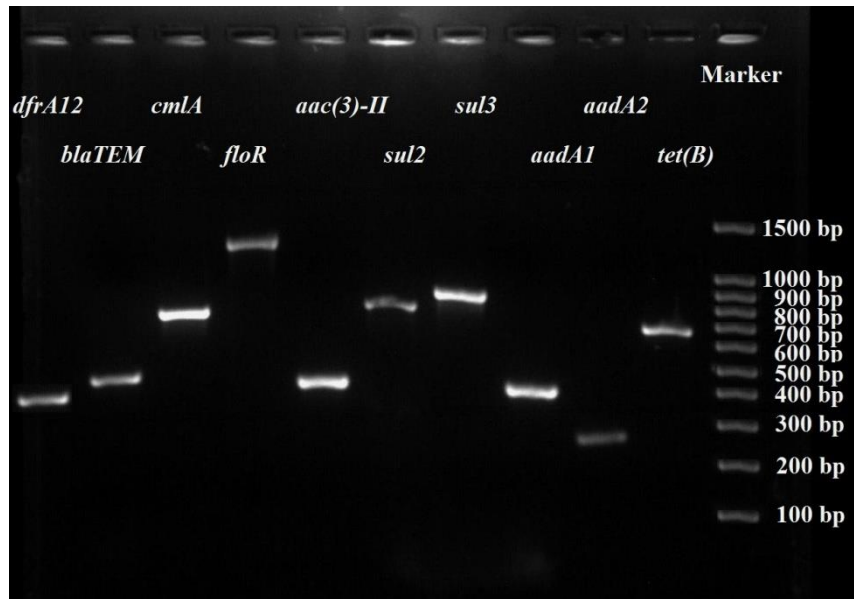
Rezistencija na trimetoprim kodirana je preko gena dihidrofolat reduktaze (*dfr*), koji su metodom PCR nađeni kod 12 izolata *E. coli*. Najzastupljeniji gen *dfrA5/A14* je nađen kod dva izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava (4M-13 i 7M-14) i kod tri izolata *E. coli* poreklom od svinja (6S-13, 14S-14 i 15S-14). Gen *dfrA1* je nađen kod dva izolata iz mleka krava (2M-13 i 6M-13) i kod dva izolata od svinja (5S-13 i 11S-13). Gen *dfrA7/A17* detektovan je kod dva izolata *E. coli* od svinja, i to kod 3S-13 i 7S-13, dok je gen *dfrA12* nađen samo kod jednog izolata *E. coli* iz mleka krava (1M-13), (Tabela 8).

Rezistencija na tetracikline

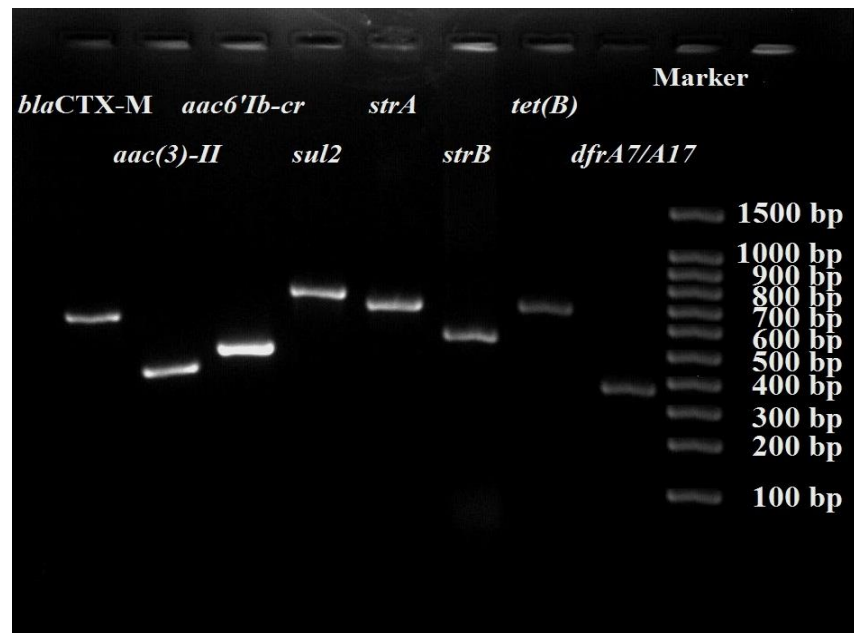
Za rezistenciju prema tetraciklinu odgovorani su *tet* geni, koji kodiraju transmembranske proteine efluks pumpe. Metodom PCR *tet* geni su nađeni kod svih 22 izolata *E. coli*, uključenih u istraživanje. Kao pojedinačni geni, *tetA* gen je detektovan kod 11 izolata *E. coli* (2M-13, 3M-13, 4M-13, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 5S-13, 11S-13, 12S-13, 13S-14 i 14S-14), a *tetB* kod 10 izolata *E. coli* (1M-13, 5M-14, 1S-13, 3S-13, 7S-13, 8S-13, 9S-13, 10S-13, 15S-14 i 16S-14). U kombinaciji *tetA/tetB* geni nađeni su samo kod jednog izolata *E. coli* i to kod 6S-13, (Tabela 8).

Grafikon 2. Prikaz zastupljenosti gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju kod izolata *E. coli*





Slika 27. Geni koji kodiraju rezistenciju kod izolata *E. coli* 1M-13, poreklom iz mleka krave, detektovani PCR metodom na 2% agaroznom gelu



Slika 28. Geni koji kodiraju rezistenciju kod izolata *E. coli* 7S-13, poreklom od svinje, detektovani PCR metodom na 2% agaroznom gelu

Rezistencija na hinolone i fluorohinolone

Od ukupno 22 ispitana izolata *E. coli*, poreklom iz mleka krava i od svinja, rezistencija na ciprofloksacin je utvrđena kod devet izolata, a rezistencija na nalidiksinsku kiselinu je utvrđena kod 13 izolata. Tačkaste mutacije na topoizomerazama kod izolata koji su imali MIK na CIP od 4 do 32 mg/L nađene su na *gyrA*, *parC* i *parE* genu. Na *gyrB* genu nisu nađene mutacije ni kod jednog izolata. Najčešće zastupljene aminokiselinske supstitucije (Tabela 9) su: Ser83→Leu, Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i Ser458→Ala na *parE* genu. Samo kod izolata 7S-13 nađene su mutacije Ser83→Leu, Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i Ser458→Thr na *parE* genu. Vrednost MIK-a na ciprofloksacin kod navedenog izolata bio je >128 mg/L. Samim tim izolat 7S-13 imao je najviše izraženu rezistenciju na ciprofloksacin.

Izolati *E. coli* kod kojih je ustanovljena rezistencija na nalidiksinsku kiselinu, a ne na ciprofloksacin, imali su samo jednu mutaciju na *gyrA* genu. Kod tri izolata koja su bila rezistentna na nalidiksinsku kiselinu nađena je supstitucija Ser83→Leu, a samo kod jednog izolata je nađena supstitucija Asp87→Asn, (Tabela 9). Kod izolata kod kojih je MIK na CIP iznosio 0,015, 0,007 i 0,004 mg/L nije urađeno sekvenciranje QRDR dela gena (quinolone resistance-determining region) koji kodiraju topoizomerase, iz razloga što su navedeni izolati osetljivi na hinolone.

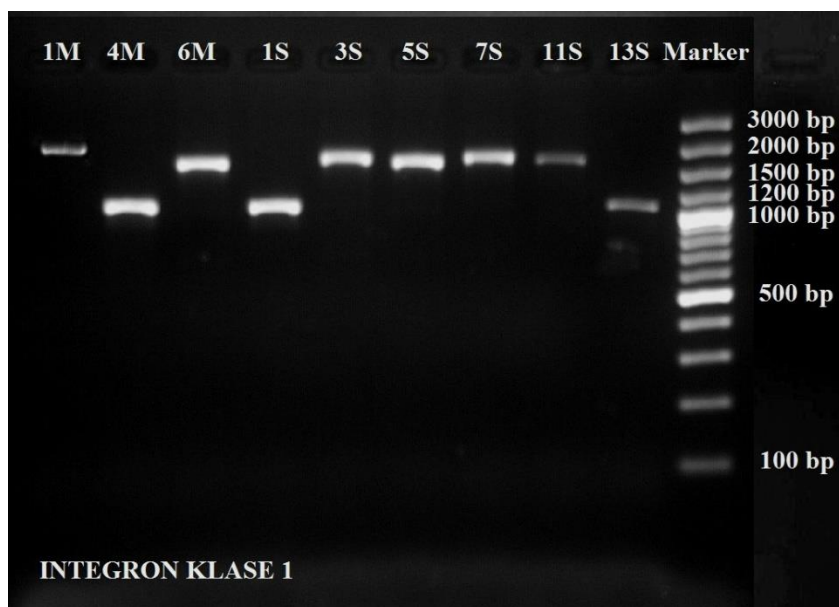
Tabela 9. Geni rezistencije, genske kasete i mutacije na topoizomeraza genima

Oznaka i poreklo izolata	Geni rezistencije i genske kasete				MIK CIP mg/L	Mutacije na topoizomeraza genima		
	Integraza geni	Integrioni	Genske kasete	Pristupni broj u banci gena		gyrA	parC	parE
1M-13, mleko	Int1	Integron 1 (2000bp)	<i>aadA2</i> , <i>linF</i>	KU886319	32	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	Ser458→Ala
2M-13, mleko	Int1	-	-		16	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	Ser458→Ala
3M-13, mleko	-	-	-		32	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	Ser458→Ala
4M-13, mleko	Int1	Integron 1 (1100bp)	<i>aadA1</i>	KU948605	0.125	Ser83→Leu	-	-
5M-14, mleko	-	-	-		0.015	ND	ND	ND
6M-13, mleko	Int1	Integron 1 (1800bp)	<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>	KU948607	0,007	ND	ND	ND
7M-14, mleko	Int1	-	<i>aadA1</i>		0.015	ND	ND	ND
1S-13, svinja	Int1	Integron1 (1100bp)	-	KU948603	0.25	Ser83→Leu	-	-
2S-13, svinja	-	-	-		16	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	Ser458→Ala
3S-13, svinja	Int1	Integron1 (1800bp)	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	KU948604	4	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	-
5S-13, svinja	Int1	Integron 1 (1800bp)	<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>	KU948606	0.062	Asp87→Asn	-	-
6S-13, svinja	-	-	-		8	Ser83→Leu Asp87→Gly	Glu84→Lys	-
7S-13, svinja	Int1	Integron 1 (1800bp)	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	KY284051	>128	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	Ser458→Thr
8S-13, svinja	Int2	-	-		0/004	ND	ND	-
9S-13, svinja	-	-	-		0.007	ND	ND	-
10S-13, svinja	-	-	-		0.007	ND	ND	-
11S-13, svinja	Int1	Integron 1 (1800 bp)	<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>	KU948608	0.007	ND	ND	-
12S-13, svinja	-	-	-		0.5	Ser83→Leu	-	-
13S-14, svinja	Int1	Integron 1 (1100 bp)	<i>aadA23</i>	KU948609	0.007	ND	ND	-
14S-14, svinja	Int1	Integron 1 (1800 bp)	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	KU948610	32	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	-
15S-14, svinja	Int1	Integron 1 (1800 bp)	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i>	KU956956	16	Ser83→Leu Asp87→Asn	Ser80→Ile	-
16S-14, svinja	int1, int2	Integron 1 (1100 bp) Integron 2 (1800 bp)	<i>I-1</i> , <i>aadA23</i> <i>I-2</i> , <i>aadA1</i> , <i>sat2</i>	KU956958 KU956957	0.125	-	-	-

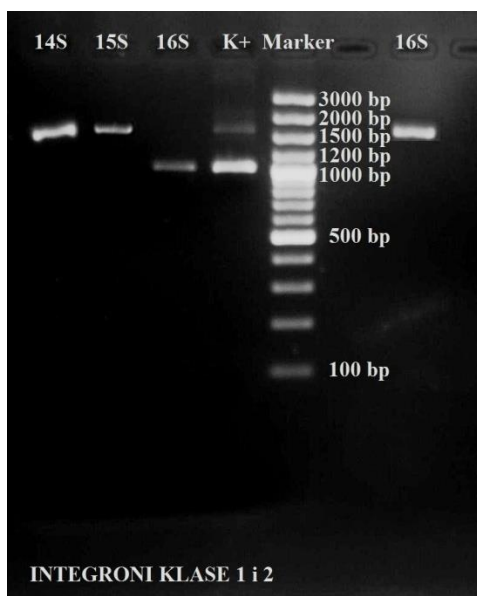
*CIP-ciprofloksacin, ND-nije diferencirano

Primenom PCR metode i sekvenciranjem amplifikata kod tri izolata *E. coli* nađeni su geni koji se nalaze na plazmidu, i to kod izolata 3M-13 i 7S-13 gen *aac(6')-Ib-cr*, a kod izolata 16S-14 gen *qnrS*, (Tabela 8).

U našim istraživanjima integroni klase 1 detektovani su kod 12 izolata *E. coli* (Slike 29 i 30), i to kod tri izolata poreklom iz mleka krava sa mastitisom (1M-13, 4M-13 i 6M-13) i kod devet izolata *E. coli* poreklom od svinja koje su imale dijareju (1S-13, 3S-13, 5S-13, 7S-13, 11S-13, 13S-14, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), (Tabela 9). Integron klase 2 detektovan je samo kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje (16S-14), u kombinaciji sa integronom klase 1 (Slika 30). Najčešće zastupljena kombinacija genskih kaset je *dfrA17-aadA5* i to kod četiri izolata *E. coli* poreklom od svinja (3S-13, 7S-13, 14S-14 i 15S-14). Kombinacija genskih kaset *dfrA1-aadA1* detektovana je kod tri izolata *E. coli* (6M-13, 5S-13 i 11S-13). Dva izolata *E. coli* imaju gensku kasetu *aadA1* (4M-13 i 7M-13), dok gensku kasetu *aadA23* imaju izolati 13S-14 i 16S-14. Kod izolata *E. coli* 1M-13 nađene su genske kasete *aadA2-linF*, a kod izolata 16S-14, u integronu klase 2, detektovane su genske kasete *aadA1-sat2*. Kod dva izolata *E. coli* (2M-13 i 8S-13), iako su PCR metodom detekovani *int1* i *int2*, nisu nađeni integroni klase 1 i 2 (Tabela 9).



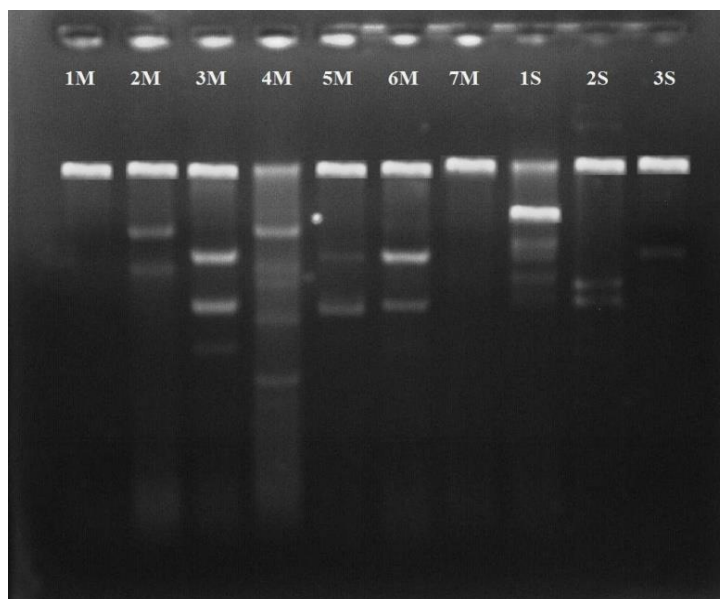
Slika 29. Integroni klase 1 kod izolata *E. coli* detektovani PCR metodom na 2% agaroznom gelu



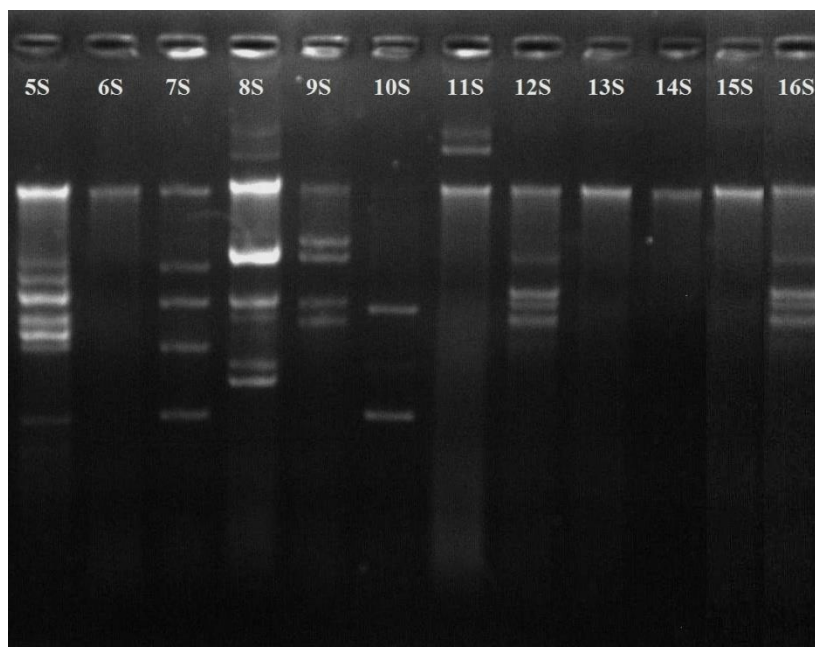
Slika 30. Integroni klase 1 i 2 kod izolata *E. coli* detektovani PCR metodom na 2% agaroznom gelu

5.6. Utvrđivanje prenosa plazmida eksperimentom konjugacije

Izolacijom plazmida dokazano je njihovo prisustvo kod svih 22 izolata *E. coli*, poreklom iz mleka muznih krava i svinja. Vizuelizacijom na 1% agaroznom gelu uočavaju se fragmenti plazmidske DNK, (Slike 31 i 32).



Slika 31. Izolovani plazmidi donora *E. coli* od 1M-13 do 3S-13 na 1% agaroznom gelu



Slika 32. Izolovani plazmidi donora *E. coli* od 5S-13 do 16S-14 na 1% agaroznom gelu

U našim istraživanjima konjugabilni plazmidi su nađeni kod 16 izolata *E. coli* (1M-13, 2M-13, 3M-13, 4M-13, 5M-14, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 5S-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14), odnosno kod 73% ispitanih sojeva. Kod ostalih šest izolata, odnosno 27% (1S-13, 3S-13, 7S-13, 10S-13, 11S-13 i 13S-13), nisu se preneli plazmidi. Najviše gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike bilo je zastupljeno na plazmidima dobijenim konjugacijom kod *E. coli* transkonjuganata 1M-13 i 4M-13. Kod *E. coli* transkonjuganta 1M-13 detektovana je rezistencija na ampicilin, hloramfenikol, gentamicin, sulfonamide i trimetoprim, dok je kod *E. coli* transkonjuganta 4M-13 detektovana rezistencija prema ampicilinu, gentamicinu, sulfonamidima, trimetoprimu i tetraciklinu, (Tabela 10).

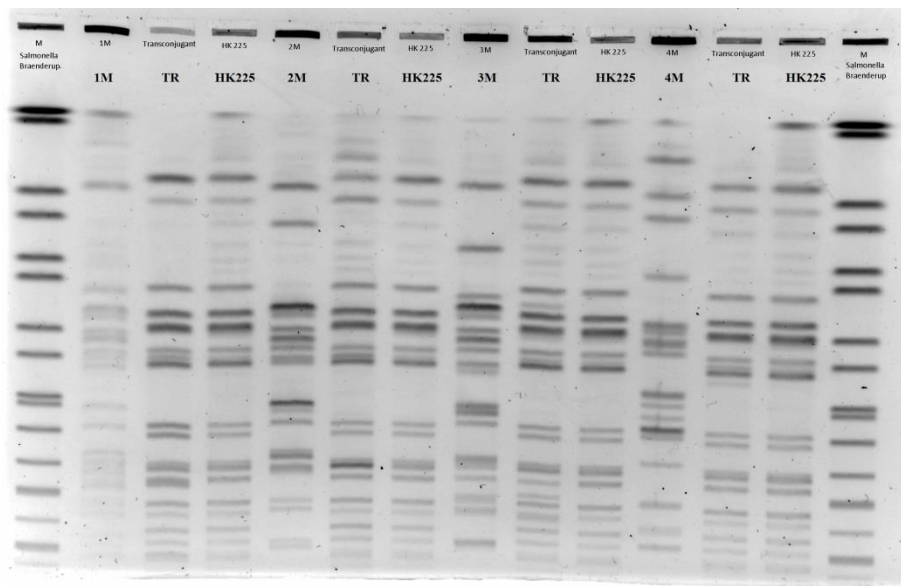
Tabela 10. Rezistotip donora, rezistotip transkonjuganata i geni rezistencije detektovani kod transkonjugana metodom PCR

Oznaka izolata	Rezistotip donora	Rezistotip transkonjuganta	Geni rezistencije detektovani kod transkonjuganata
1M-13 mleko	AMX, AMP, CIP, CHL, FLO, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, CHL, GEN, SA, SXT TMP	<i>bla_{TEM}</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>cmlA</i> , <i>floR</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i>
2M-13 mleko	AMX, AMP, CIP, CHL, FLO, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, SA	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i>
3M-13 mleko	AMX, AMP, CIP, NAL, SA, STR, TET	AMP, SA, TET	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
4M-13 mleko	AMX, AMP, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, GEN, SA, SXT TET, TMP	<i>bla_{TEM}</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA5-14</i> , <i>tetA</i>
5M-14 mleko	STR, SA, TET	TET	<i>tetB</i>
6M-13 mleko	AMX, AMP, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, SA, TET	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
7M-14 mleko	AMX, AMP, CTX, CPD, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, CPD, CTX, SA	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i> , <i>sul2</i>
2S-13 svinja	AMX, AMP, CIP, NAL, SA, STR, TET	AMP, SA, TET	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
5S-13 svinja	AMX, AMP, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, SA	<i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>
6S-13 svinja	AMX, AMP, CIP, CHL, FLO, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP, CHL, SA, TET	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i>
8S-13 svinja	AMX, AMP, CHL, FLO, SA, STR, TET	AMP, CHL, SA	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i>
9S-13 svinja	AMX, AMP, FLO, SA, STR, TET	AMP, CHL, SA	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i> , <i>sul1</i>
12S-13 svinja	AMX, AMP, CHL, FLO, NAL, STR, TET	AMP, CHL	<i>bla_{TEM}</i> , <i>floR</i>
14S-14 svinja	AMX, AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP	<i>bla_{TEM}</i>
15S-14 svinja	AMX, AMP, CIP, CHL, GEN, NAL, SA, STR, SXT, TET, TMP	AMP	<i>bla_{TEM}</i>
16S-14 svinja	AMX, AMP, CHL, GEN, SA, STR, TET	AMP	<i>bla_{TEM}</i> , <i>qnrS</i>

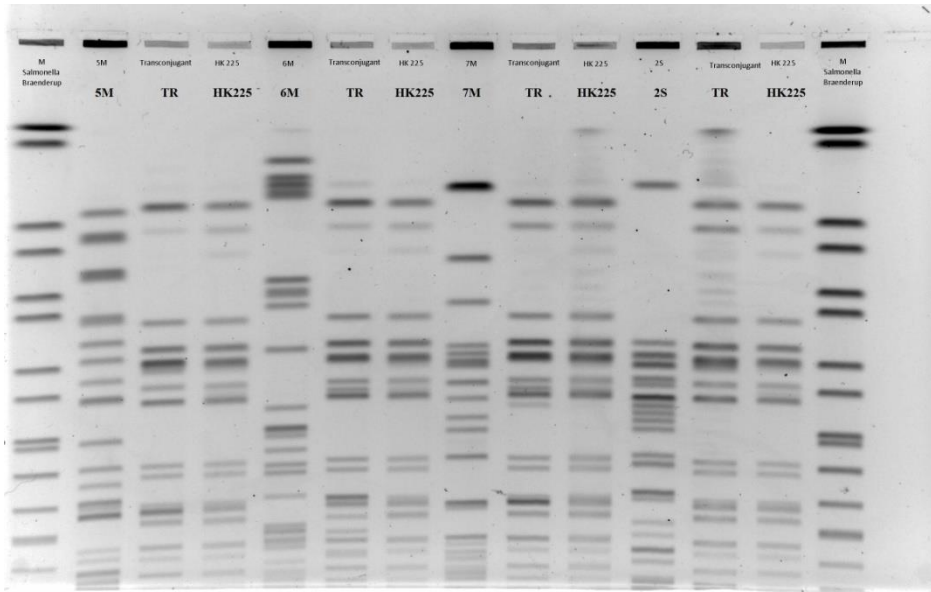
Najviše su se preko plazmida preneli geni koji kodiraju rezistenciju na ampicilin. Od ukupno 16 dobijenih *E. coli* transkonjuganta, gene koji kodiraju rezistenciju na ampicilin imalo je 15 transkonjuganata (1M-13, 2M-13, 3M-13, 4M-13, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 5S-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13, 12S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14). Geni koji kodiraju rezistenciju na sulfonamide detektovani su kod 11 od 16 *E. coli* transkonjuganata (1M-13, 2M-13, 3M-13, 4M-13, 6M-13, 7M-14, 2S-13, 5S-13, 6S-13, 8S-13 i 9S-13). Kod šest *E. coli* transkonjuganata nađeni su geni koji kodiraju rezistenciju na tetraciklin (3M-13, 4M-13, 5M-14, 6M-13, 2S-13 i 6S-13), dok su geni koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide i trimetoprim nađeni kod dva *E. coli* transkonjuganta (1M-13 i 4M-13). Gen *floR*, koji kodira rezistenciju na florfenikol, nađen je kod

pet *E. coli* transkonjuganata (1M-13, 6S-13, 8S-13, 9S-13 i 12S-13), od čega je kod transkonjuganta 1M-13 pored *floR* gena nađen i *cmlA* gen. Na konjugabilnom plazmidu *E. coli* transkonjuganta 7M-14, metodom PCR nađeni su geni *bla*_{TEM} i *bla*_{CTX-M-1} zajedno sa genom *sul2*, koji kodira rezistenciju na sulfonamide. Kod *E. coli* transkonjuganta 16S-14 na konjugabilnom plazmidu detektovan je *bla*_{TEM} i *qnrS* gen koji kodira plazmidski prenosivu rezistenciju na fluorohinolone, (Tabela 10).

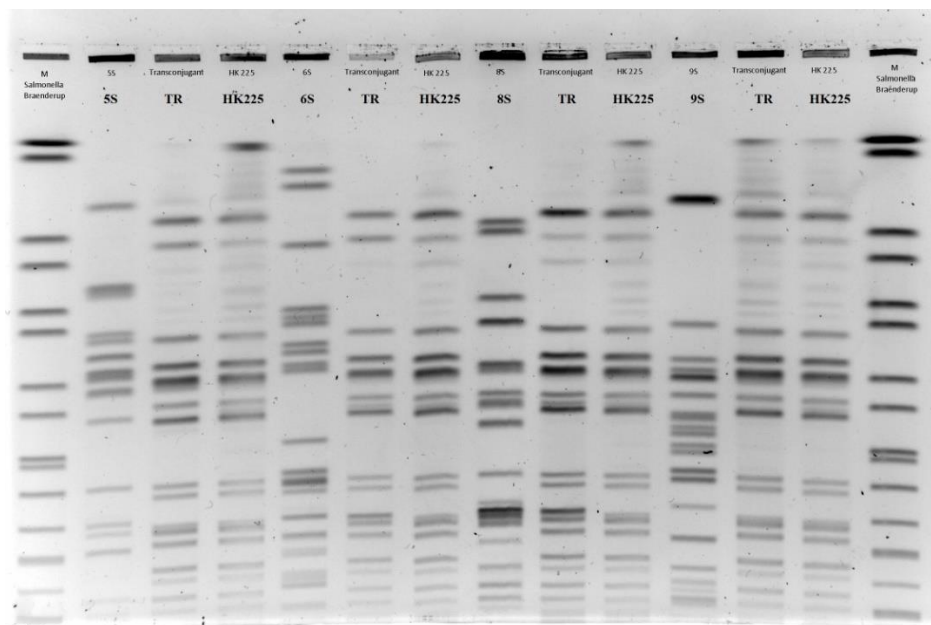
Metodom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) determinisan je genetički profil dobijenih transkonjuganata, koji je identičan ili blizak recipijentu *E. coli* HK225, a potpuno različit u odnosu na *E. coli* donora (Slike 34, 35, 36 i 37).



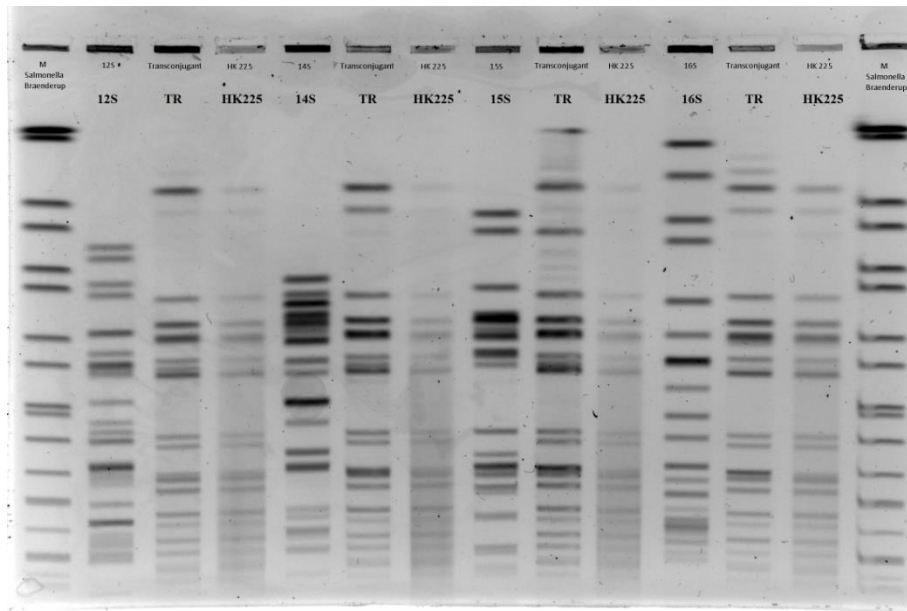
Slika 34. PFGE fragmenti *E. coli* donora, *E. coli* recipijenta HK225 i *E. coli* dobijenih transkonjuganata (1M-13, 2M-13, 3M-13 i 4M-13)



Slika 35. PFGE fragmenti *E. coli* donora, *E. coli* recipijenta HK225 i *E. coli* dobijenih transkonjuganata (5M-13, 6M-13, 7M-13 i 2S-13)



Slika 36. PFGE fragmenti *E. coli* donora, *E. coli* recipijenta HK225 i *E. coli* dobijenih transkonjuganata (5S-13, 6S-13, 8S-13 i 9S-13)



Slika 37. PFGE fragmenti *E. coli* donora, *E. coli* recipijenta HK225 i *E. coli* dobijenih transkonjuganata (12S-13, 14S-14, 15S-14 i 16S-14)

6. DISKUSIJA

Pojava rezistencije bakterija na antibiotike je odavno postala globalni problem, posebno zbog toga što bakterije mogu da postanu rezistentne na sve antibiotike koji su danas u upotrebi. Primena antibiotika u poljoprivredi i stočarstvu znatno je doprinela širenju multirezistentnih bakterija u životnoj sredini. Iz navedenih razloga intenzivno se izučavaju genetički mehanizmi rezistencije bakterija i mehanizmi invazivnosti koje one koriste za kolonizaciju.

Veliki napredak u nauci je postignut poslednjih nekoliko decenija primenom metode sekvenciranja celog genoma što doprinosi proučavanju bioloških procesa kod bakterija. Međutim, i dalje se koriste osnovne mikrobiološke metode kao i metode klasične molekularne biologije za ispitivanje fenotipskih i genotipskih karakteristika mikroorganizama. Rezistotipizacija se koristi kao najvažniji fenotipski test za utvrđivanje osetljivosti bakterija na antibiotike, a u velikom broju laboratorija u svetu detaljno se izučavaju procesi regulacije ekspresije gena kod mikroorganizama uključujući i gene za rezistenciju.

E. coli se rutinski koristi u mnogim molekularnim istraživanjima za eksperimente kao što su konjugacija, transformacija i kloniranje. *E. coli* može da izgubi ili dobije plazmide i isto tako da prihvati ili odstrani iz svog genoma mobilne genetičke elemente kako bi obezbedila uslove za preživljavanje u životnoj sredini. Zahvaljujući tome što je *E. coli* komensal crevnog trakta ljudi i životinja, i zbog njenih genetičkih karakteristika, koristi se za ispitivanje rezistencije na antibiotike kao indikatorski mikroorganizam (Hendriksen i sar., 2008).

Intenzivna upotreba antibiotika u humanoj medicini, stočarstvu i poljoprivredi, dovela je do oslobađanja velike količine antibiotika u biosferu, što je uticalo na promenu životne sredine, tako da su bakterije morale da se adaptiraju na nove uslove, aktiviranjem mnogobrojnih mehanizama rezistencije (Sköld, 2001). Interesantno je da su neki geni za rezistenciju uspeali da se održe i mnogo godina posle prekida primene određenih klasa antibiotika. Na primer, rezistencija na hloramfenikol, koji se ne koristi u humanoj medicini od 1994. godine i dalje je veoma zastupljena kod bakterija zahvaljujući tome što se geni za rezistenciju prenose preko konjugabilnih multirezistentnih plazmida i transpozona. Rezistencija na sulfonamide je takođe rasprostranjena kod bakterija, iako se sulfonamidi danas retko koriste u kliničkoj praksi (Sköld, 2000). Rezistencija na fluorohinolone, beta laktame i aminoglikozide zabrinjava zbog toga što se

ovi antibiotici intenzivno koriste za lečenje ljudi širom sveta. Utvrđeno je da se rezistencija bakterija na određene klase antibiotika razvija brzo, pogotovo ako je primena antibiotika prekomerna, a opada sporo ukoliko se smanji njihova upotreba. Rezistentne bakterije se brzo nađu u životnoj sredini, a potrebne su decenije da nestanu (Levy i Marshal, 2004).

Prema standardima Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) i Instituta za standarde kliničkih i laboratorijskih ispitivanja (CLSI), rezistencija na antibiotike se ispituje mikrodilucionom metodom tako što se utvrđuje minimalna inhibitorna koncentracija u zavisnosti od vrste mikroorganizma na određene antibiotike (MIK). Kod bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* ispituje se osetljivost na 14 antibiotika mikrodilucionom metodom (EFSA, 2017). Ovaj test se u rutinskoj praksi koristi u malom broju laboratorija u Srbiji, a za rutinsko izveštavanje osetljivosti bakterija na antibiotike potrebna je primena automatizovanih sistema za očitavanje antibiotske rezistencije.

U našim istraživanjima proučavana je rezistencija izolata *E. coli* iz mleka krava sa kliničkim mastitisom i fecesa svinja koje su imale dijareju, na osnovu rezistotipizacije i analize MIK-a za 14 antibiotika. Pored rezistencije na antibiotike urađena je i molekularna tipizacija kako bi ispitali genetičku srodnost izolata *E. coli* poreklom sa 22 farme muznih krava i svinja, kao i njihovu filogenetsku pripadnost. Determnisani su i geni za rezistenciju kod svih izolata *E. coli* i transkonjuganata.

6.1. Molekularna tipizacija izolata *E. coli*

Za filogenetsku tipizaciju izolata *E. coli* u našim istraživanjima korišćena je metoda multipleks PCR sa tri prajmera kojom se detektuju dva gena i jedan genski fragment *chuA*, *yjaA* i *TspE*. Ovu metodu uspostavili su Clermont i saradnici 2000. godine. Geni *chuA*, *yjaA* i *TspE* su stabilni, odnosno nisu podložni deleciji ili inserciji, a njihovi produkti nisu podložni prirodnoj selekciji koja favorizuje genetičke rekombinacije tokom evolucije bakterija. Zbog navedenih karakteristika ovi geni mogu da se koriste za istraživanje filogenetske tipizacije *E. coli*. Clermont i saradnici su uspostavili sistem koji može da identifikuje ekstraintestinalne *E. coli* koje pripadaju filogenetskoj grupi B2 i komensalne *E. coli* koje pripadaju filogenetskoj grupi A. U grupi B1 su takođe uglavnom komensali, a u grupi D mogu da budu i ekstraintestinalne i komensalne *E. coli*. Filogenetska tipizacija *E. coli* omogućava da se identifikuju potencijalno

virulentni izolati *E. coli* (grupa B2) u odnosu na komensale koji uglavnom pripadaju grupama A i B1 (Clermont i sar., 2000).

Clermont i saradnici su 2011. godine takođe ispitivali srodnost izolata *E. coli* poreklom od ljudi i životinja u odnosu na njihovu filogenetsku pripadnost i u odnosu na njihove faktore virulencije. Autori su zapazili da izolati *E. coli* koji uzrokuju ista oboljenja kod različitih domaćina (ljudi ili životinja) imaju iste gene za virulenciju i obično pripadaju filogenetskoj grupi B2, bez obzira na njihovo poreklo. Sa druge strane, specifični adhezini kod *E. coli* koji nisu u grupi B2, nađeni su kod patogenih izolata od životinja i samim tim takvi izolati nisu genetički srodni sa humanim (Clermont i sar., 2011).

U našim istraživanjima od ukupno 22 ispitana izolata *E. coli* 17 izolata pripada filogenetskoj grupi A (77%). Od toga šest izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava i 11 izolata poreklom od svinja. Tri izolata *E. coli* pripadaju filogenetskoj grupi B₁ (13%), dva poreklom od svinja i jedan iz mleka krave, dok dva izolata *E. coli* poreklom od svinja pripadaju filogenetskoj grupi D (9%).

Genetička tipizacija metodama elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD), je pokazala da su sva 22 ispitana izolata *E. coli* genetički nesrodna, tako da nije utvrđena klonalna ekspanzija multirezistentnih sojeva. Iako se analiza po jednog izolata sa svake farme koristi kod ispitivanja rezistencije na antibiotike, za otkrivanje klonalnih *E. coli* bilo bi potrebno analizirati metodama molekularne tipizacije više izolata od jedne životinje i više izolata sa jedne farme.

Kod multirezistentne *E. coli*, mnogo faktora utiče na pojavu klona. Sa aspekta rezistencije trebalo bi da bakterija nasledi karakteristične plazmide sa specifičnim genima za rezistenciju, koji pripadaju istoj inkompatibilnoj grupi. Bakterije mogu da dobiju, razmene ili naslede gene koji kodiraju brojne faktore virulencije uključujući i faktore adhezivnosti koji utiču na afinitet prema domaćinu. Mnoge od ovih fenotipskih i genotipskih osobina mogu da se zadrže u okruženju zahvaljujući plazmidima. To podrazumeva i epidemijske plazmide koji su karakteristični po tome što mogu da ih naslede i nesrodne bakterije koje nisu epidemiološki povezane. Posvećuje im se velika pažnja zato što obično sadrže gene za rezistenciju na važne

klase antibiotika i mogu da se diseminiraju u celom svetu. Na primer, to su plazmidi koji imaju gene za rezistenciju na prošireni spektar beta-laktama i karbapeneme (Carattoli, 2013).

Od ukupno 12 izolata *E. coli* koji su rezistentne na prošireni spektar beta-laktama, a potiču od krava sa mastitisom sa različitih farmi lociranih u jugozapadnom delu Nemačke, dva izolata pokazala su iste genetičke profile metodama PFGE i MLST (multi locus sequence type) iako su farme udaljene jedna od druge 40 km. Druga dva izolata od mleka krava sa mastitisom sa farmi koje su udaljene 36 km bila su blisko srodna, dok su iz jednog uzorka mleka izolovane dve *E. coli* sa istim plazmidom, ali različitim PFGE i MLST profilom. U poslednjem slučaju došlo je do razmene plazmida *in vivo* kod genetički nesrodnih izolata *E. coli* kod krave sa mastitisom, zaključuju autori (Freitag i sar., 2017).

Klonalno širenje *E. coli* na farmama se retko spominje u literaturi. Među retkim primerima su istraživanja Sawant i saradnika iz 2007. godine, u kojima je dokazano prisustvo klona kod izolata *E. coli* koje su rezistentne na tetraciklin, a poticale su od zdravih mlečnih krava. Autori su pokazali da se genetički srodni izolati *E. coli* u ponavljanim ispitivanjima mogu dokazati kod istih krava sa iste farme, ali nisu dokazali genetičku srodnost sa izolatima *E. coli* od zdravih mlečnih krava sa drugih farmi, bez obzira što im je rezistencija na tetraciklin zajednička osobina (Sawant i sar., 2007). Izolati *E. coli* u našim istraživanjima nisu genetički srodni i imaju različit rezistotip, a kod gotovo svakog izolata nađene su različite kombinacije gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike. Iako *E. coli* iz mleka krava sa mastitisom i od svinja sa dijarejom uglavnom pripadaju filogenetskoj grupi A, imaju različite gene za rezistenciju, i poseduju različite mobilne genetičke elemente na plazmidima ili hromozomu.

6.2. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike

Za rezistenciju na beta laktamske antibiotike odgovorni su enzimi beta-laktamaze. Ovi enzimi su kodirani preko gena koji su uglavnom na plazmidima ili drugim mobilnim genetičkim elementima. Zahvaljujući mobilnosti njihovih specifičnih gena rezistencije, bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* koje proizvode enzime proširenog spektra beta-laktama su veoma rasprostranjene u celom svetu.

U našim istraživanjima detektovana su dva izolata *E. coli* koji proizvode ESBL i to iz mleka krave sa mastitisom i od svinje. Kod oba izolata determinisan je *bla*_{CTX-M-1} gen odgovoran

za rezistenciju. Izolat *E. coli* iz mleka krave (7M-14) koji produkuje CTX-M-1 poseduje konjugabilni plazmid kojim se prenosi *bla*_{CTX-M-1} gen. Izolat *E. coli* poreklom od svinje (7S-13) koji je rezistentan i na fluorohinolone takođe poseduje *bla*_{CTX-M-1} gen, ali u eksperimentu konjugacije nismo dokazali da je plazmid od donora ovog izolata konjugabilan. Kod izolata *E. coli* poreklom iz mleka krave (3M-13) detektovan je gen *bla*_{OXA-1}, a kod izolata *E. coli* takođe poreklom iz mleka krave (6M-13) detektovan je gen *bla*_{CTX-M8-25}, ali nije potvrđeno da ovi izolati imaju sposobnost produkcije ESBL.

Bakterije koje produkuju ESBL (najčešće *Klebisella pneumoniae*) su prvi put otkrivene u Nemačkoj i Engleskoj 1983. godine, a u SAD su prvi put detektovane 1988. godine (Rupp i Fey, 2003). U početku su one detektovane kao bolnički izolati, međutim od 2000. godine, dolazi do globalne diseminacije CTX-M ESBL produkujućih bakterija tako da navedeni genotip danas dominira u celom svetu. Smatra se da je hrana životinjskog porekla jedan od njenih važnijih izvora (Bevan i sar., 2017).

U Danskoj se na farmama svinja kod kojih se u terapiji koriste cefalosporini treće i četvrte generacije može izolovati značajno više *E. coli* koje produkuju CTX-M u odnosu na farme koje ne koriste cefalosporine u terapiji. Daljim ispitivanjima ustanovljeno da su ljudi koji su imali kontakt sa svinjama koje su lečene cefalosporinima, u značajno većem broju bili i sami inficirani sa bakterijom *E. coli* koja produkuje CTX-M, u odnosu na ljude koji su zaposleni na farmama gde se ne koriste cefalosporini u terapiji svinja. Kod tih izolata *E. coli* najzastupljeniji su bili *bla*_{CTX-M1} i *bla*_{CTX-M-14} geni, a ovi geni su bili locirani na plazmidima različitih inkompatibilnih grupa, *IncN*, *IncF* i *IncII* (Hammerum i sar., 2014).

Rasprostranjenost CTX-M genotipa kod izolata *E. coli* poreklom od zdravih svinja i goveda izučavana je i u Koreji. Značajno je veći broj *E. coli* izolovano od svinja koje su produkovale ESBL u odnosu na izolate *E. coli* od goveda. Dokazana je velika zastupljenost CTX-M-14, potom CTX-M-15, CTX-M-3, CTX-M-55, CTX-M-27 i CTX-M-65. Ova činjenica objašnjava se time što se u Koreji za profilaksu i terapiju u svinjarstvu koriste florfenikol i sulfametazin pa se geni *bla*_{CTX-M} koselektuju sa genima odgovornim za rezistenciju na florfenikol i sulfonamide na multirezistentnim plazmidima u mnogo većoj meri u svinjarstvu nego govedarstvu. Eksperimenti konjugacije pokazali su da se većina *bla*_{CTX-M} gena prenela na

recipijente, što objašnjava visoku zastupljenost *bla*_{CTX-M} gena kod izolata *E. coli* od svinja u Koreji (Tamang i sar., 2013).

U okviru veterinarskog monitoringa u Nemačkoj, za period 2008-2014. godine obuhvaćeno je 6849 kliničkih izolata *E. coli* i ispitano da li produkuju ESBL. Utvrđeno je da 6,1% izolata *E. coli* produkuje ESBL i da je *bla*_{CTX-M1} gen bio najzastupljeniji kod 69,9% izolata (Michael i sar., 2017).

Geni *bla*_{TEM} i *bla*_{CTX-M} su detektovani kod ptica grabljivica i to prvi put u Portugaliji gde je kod pet izolata *E. coli*, koji su bili rezistentni na dva i više antibiotika, nađena kombinacija *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{TEM-1} i *bla*_{TEM-52} gena (Costa i sar., 2006), a potom i kod izolata *E. coli* od ptica grabljivica u Nemačkoj i Mongoliji, gde je najčešće determinisan *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{CTX-M-9} gen (Guenther i sar., 2012). Divlje životinje i ptice mogu da budu inficirane bakterijama koje produkuju ESBL što dodatno doprinosi njihovoj zastupljenosti u životnoj sredini (Dolejská i sar., 2009).

6.3. Rezistencija na hinolone i fluorohinolone

Rezultati naših istraživanja su pokazali pozitivnu korelaciju između rezistotipa, MIK vrednosti i determinacije gena za rezistenciju. Najviše zabrinjava rezistencija na fluorohinolone, koja nastaje zahvaljujući mutacijama na genima koji kodiraju topoisomerase. Ove mutacije uzrokuju promenu aminokiselina na mestima vezivanja hinolona i time značajno umanjuju ili blokiraju delovanje antibiotika. Rezistencija na hinolone nastaje isključivo zbog upotrebe antibiotika u kliničkoj praksi ili preventivi (Hopkins i sar., 2005).

Diseminacija rezistentnih bakterija u zapatima životinja dokazana je i eksperimentalno. Svinje koje su inficirane bakterijom *E. coli* koja je rezistentna na ciprofloksacin izlučuju rezistentne bakterije u okolinu. Svinje koje su se inficirale kontaktom izlučivale su *E. coli* rezistentnu na ciprofloksacin već posle dva dana sa tendencijom pada izlučivanja posle četvrtog do petog dana i ponovnog porasta počev od šestog dana, što govori u prilog reinfekcije (Andraud i sar., 2011). Može se zaključiti da se na farmama koje su kontaminirane multirezistentnim bakterijama često dešava reinfekcija životinja u zapatima i da su i ljudi izloženi tim bakterijama, što je i dokazano u istraživanjima sprovedenim u Danskoj (Hammerum i sar., 2014).

U našim istraživanjima kod pet izolata *E. coli* su nađene mutacije na tri gena i to *gyrA*, *parC* i *parE*, što je uzrokovalo visoke MIK vrednosti na ciprofloksacin. Kod četiri genetički nesrodna izolata *E. coli* (1M-13, 2M-13, 3M-13 i 2S-13) sa MIK vrednostima na ciprofloksacin od 16-32 mg/L, nađene iste mutacije na tri ciljna gena i to Ser83→Leu, Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i Ser458→Ala na *parE* genu, dok su kod izolata 7S-13 nađene mutacije Ser83→Leu, Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i Ser458→Thr na *parE* genu, a MIK je bio >128 mg/L. Takođe, kod izolata *E. coli* sa samo jednom tačkastom mutacijom na *gyrA* genu nađene su povišene vrednosti MIK-a na ciprofloksacin, odnosno 0,125 mg/L, 0.25 mg/L, 0.062 mg/L i 0.5 mg/L (za izolate 4M-13, 1S-13, 5S-13, 12S-13, redom navođenja). Kod navedenih izolata vrednosti MIK-a za nalidiksinsku kiselinu su iznosile 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L i 256 mg/L, redom navođenja. Kod ovih izolata identifikovane su tačkaste mutacije na *gyrA* genu i to Ser83→Leu ili Asp87→Asn. Može se zaključiti da je rezistencija na nalidiksinsku kiselinu uglavnom uzrokovana mutacijama na *gyrA* genu, a da u slučaju intenzivne primene fluorohinolona u terapiji može da dođe do pojave visoke rezistencije i na fluorohinolone (Lautenbach i sar., 2006).

Kod izolata koji su rezistentni na fluorohinolone nalazi se više mutacija na genima koji kodiraju topoizomeraze. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti na fluorohinolone pokazalo je da su primarno mutacije uvek na *gyrA* genu i da samo jedna tačkasta mutacija na *parC* ne dovodi do kliničke rezistencije na nalidiksinsku kiselinu (Lautenbach i sar., 2006). Visoke vrednosti MIK-a na ciprofloksacin nastaju ukoliko postoje dve tačkaste mutacije na *gyrA* ili ukoliko ima mutacija i na drugim genima, odnosno *gyrB*, *parC* i/ili *parE*. Samo ukoliko je MIK na ciprofloksacin >0.5 mg/L može da se očekuje mutacija i na *parC* genu, tako da se koncentracija ciproflksacina od 0.5 mg/L koristi kao granična vrednost (cut-off) za otkrivanje potencijalnih mutacija na ovom genu (Piddock, 2002). Pored mutacija na topoizmerazama bakterije često koriste i efluks pumpu za izbacivanje štetnih supstanci izvan bakterijske ćelije, ali kod salmonela i *E. coli*, efluks pumpa je najčešće sekundarni mehanizam rezistencije.

Veliki značaj pridaje se rezistenciji na hinolone za koju su odgovorni geni na plazmidima (PMQR). Ukoliko bakterija poseduje samo gen za rezistenciju na hinolone na plazmidu, a nema mutacija na genima koji kodiraju topoizomeraze, onda rezistencija nije visoka. Ukoliko se geni koji kodiraju proteine i enzime koji uzorkuju rezistenciju na hinolone nalaze na

konjugabilnim plazmidima, obično tada mogu da se prenesu sa jedne bakterije na drugu zajedno sa drugim genima za rezistencije. Osim toga rezistencija na hinolone preko gena sa plazmida omogućava bakteriji da efikasnije razvije kliničku rezistenciju u prisustvu hinolona ili fluorohinolona u odnosu na bakterije koje nemaju gen za rezistenciju na hinolone koji se nalazi na plazmidu (Martínez-Martínez i sar., 2003; Robicsek i sar., 2006).

U našim istraživanjima, kod dva izolata (3M-13 i 7S-13) koji imaju visoki MIK na ciprofloksacin, detektovan je PCR metodom i sekvenciranjem gen *aac(6')-Ib-cr* koji kodira varijantni enzim aminoglikozid acetiltransferazu. Ovaj enzim vrši acetilaciju fluorohinolona čineći ih neaktivnim. Gen *aac(6')-Ib-cr* favorizuje rezistenciju na fluorohinolone kod bakterija koje su izložene ovim antibioticima, a pored rezistencije na fluorohinolone kodira i rezistenciju na strukturno različite aminoglikozide (Robicsek i sar., 2006). Kod izolata *E. coli* 16S-14 nađen je gen *qnrS* koji je uzrokovao povišen MIK na ciprofloksacin od 0,125 mg/L. Posle otkrića ovog gena (Hata i sar., 2005), *qnrS* je nađen i kod izolata *Salmonella enterica* serovar Infantis, kod pilića iz klanice (Kehrenberg i sar., 2006), i kod kliničkih izolata *E. coli* kod životinja koje se gaje za ishranu ljudi u Kini (Yue i sar., 2008), Tajvanu (Yeh i sar., 2017), iz briseva sa farmi ćuraka u Velikoj Britaniji i u mnogim drugim zemljama (Gosling i sar., 2012).

Plazmidi PMQR su rasprostranjeni u životnoj sredini kod Gram negativnih bakterija, a rezervoari su često životinje koje se uzgajaju na farmama. Kod bakterija koje imaju multiplorezistentni fenotip i poseduju PMQR plazmid, terapija sa hinolonima selektuje rezistentne mutante u populaciji i omogućava opstanak ovih bakterija čak i u prisustvu drugih antibiotika (Robicsek i sar., 2006).

6.4. Rezistencija na aminoglikozide

Bakterije inaktiviraju aminoglikozidne antibiotike putem enzimske modifikacije pomoću tri grupe enzima: aminoglikozid acetiltransferaze (AAC), aminoglikozid nukleotidiltransferaze (ANT) i aminoglikozid fosfotrasferaze (APH). Ovi enzimi imaju svoje podgrupe, a dele se prema tome na koji supstrat deluju, odnosno na kom mestu vrše modifikaciju antibiotika. Kodirani su genima *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(3)-III*, *aac(3)-IV*, *ant(2)-I* i *armA*.

U našem istraživanju je detektovan gen *aac(3)-II*, kod izolata *E. coli* poreklom od krava i svinja, koji su rezistentni na gentamicin. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa rezultatima drugih

Evropskih država gde je kod izolata *E. coli* rezistentnih na gentamicin najčešće nađen gen *aac(3)-IV*. Gen *aac(3)-IV* kodira enzim aminoglikozid acetiltransferazu koja uzrokuje kombinovanu rezistenciju na gentamicin i apramicin (Kotra i sar., 2000). Apramicin je antibiotik koji se ne koristi u stočarskoj proizvodnji u Republici Srbiji.

6.5. Rezistencija na hloramfenikol i florfenikol

Rezistencija na hloramfenikol nastaje usled aktivacije *cat* gena koji kodira enzim hloramfenikol acetiltransferazu (CAT) ili gena koji kodira transmembranske proteine odgovorne za mehanizam efluksa (*cmlA*). Geni su obično locirani na plazmidima koji mogu da budu konjugabilni i/ili se nalaze u sastavu integrona, što doprinosi diseminaciji *cat* i *cmlA* gena u prirodi (Schwarz i sar., 2004; Sunde i Norström, 2006). Izolati koji su rezistenti na hloramfenikol preko CAT enzima su osetljivi na dejstvo florfenikola. Florfenikol je rezistentan na inaktivaciju zato što je kod ovog antibiotika hidroksilna grupa na C-3 zamenjena molekulom flora (Schwarz i sar., 2004).

U našim istraživanjima rezistencija na hloramfenikol je nađena kod 10 od 22 izolata *E. coli*. Kod jednog izolata iz mleka krava nađeni su *cmlA* i *floR* geni zajedno na konjugabilnom plazmidu. Geni *floR* su nađeni kod jednog izolata iz mleka i četiri izolata od svinja dok je *cat* gen nađen kod tri izolata od svinja. Kod četiri izolata *E. coli* poreklom od svinja *floR* gen je detekovan na konjugabilnim plazmidima.

Kod izolata *E. coli* od životinja koje se uzgajaju za ishranu ljudi u Nemačkoj najzastupljeniji (68% izolata) je bio *cat* gen, a *cmlA* gen je nađen kod 36% izolata (Guerra i sar., 2003). Kod multirezistentnih izolata *E. coli* od mlečnih krava u Irskoj determinisani su *cat* ili *floR* geni kod 5 i 4% izolata, redom navođenja, a *cmlA* gen nije ustanovljen (Karczmarczyk i sar., 2011). U sastavu integrona *cat* geni su nađeni u kolekciji izolata *E. coli* iz mesa i proizvoda od mesa od svinja, goveda i živine u Norveškoj (Sunde i Norström, 2006).

6.6. Rezistencija na sulfonamide

Rezistencija na sulfonamide nastaje zbog ekspesije *sul* gena koji su locirani na plazmidima ili integronima (Sunde i Norström, 2006; Wu i sar., 2010). Kod multirezistentnih

izolata *E. coli* ova rezistencija je veoma zastupljena, ali diseminacija određene vrste gena za rezistenciju se razlikuje zavisno od geografskog područja.

U našim istraživanjima detektovani su *sul1*, *sul2* i *sul3* geni koji kodiraju enzim dihidropteroat sintetazu odgovornu za rezistenciju na sulfonamide. Gen *sul1* je detektovan kod pet izolata *E. coli*, gen *sul2* kod šest izolata, a kombinacija *sul1* i *sul2* gena nađena je kod šest izolata *E. coli*. Gen *sul3* je detektovan zajedno sa *sul2* genom kod dva izolata *E. coli* poreklom od svinja.

Rasprostranjenost *sul* gena kod izolata *E. coli* iz fecesa zdravih ljudi i svinja u Danskoj, pokazala je da su *sul1* i *sul2* geni uglavnom ujednačeno zastupljeni kod ljudi i svinja, dok *sul3* gen nije nađen u stolici zdravih osoba (Hammerum i sar., 2006; Wu i sar., 2010). Gen *sul3* je identifikovan na konjugabilnom plazmidu enterotoksične *E. coli* (oznaka izolata r10044) koja je kod svinje izazvala proliv (Perreten i Boerlin, 2003). Kod izolata multiplorezistentnih *E. coli* od goveda u Irskoj, najzastupljeniji je bio *sul2* gen, potom *sul1* gen, a *sul3* gen nije detektovan (Karczmarczyk i sar., 2011). Međutim *sul3* gen je nađen kod tri izolata *E. coli* od životinja koje služe za proizvodnju hrane u Norveškoj (Sunde i Norström, 2006), a u našim istraživanjima *sul3* gen je nađen zajedno sa *sul2* genom. Kod izolata *E. coli* od svinja, goveda i živine u Nemačkoj, najzastupljeniji je bio *sul2* gen (kod 66% izolata), potom *sul1* gen (kod 42% izolata), a *sul3* gen je nađen kod 14% izolata (Guerra i sar., 2003).

6.7. Rezistencija na trimetoprim

Rezistencija na trimetoprim nastaje zahvaljujući enzimima dihidrofolat reduktaze koji su kodirani *dfr* genima, a nalaze se u integronima kao genske kasete (Blahna i sar., 2006).

U našim istraživanjima detektovano je nekoliko vrsta *dfr* gena i nekoliko kombinacija genskih kasete u integronima kod izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava i od svinja. Najzastupljeniji gen kod dva izolata *E. coli* iz mleka krava i tri izolata od svinja je *dfrA5/14*. Kod jednog izolata *E. coli* iz mleka krave nađen je gen *dfrA12*, kod dva izolata iz mleka krava i dva izolata od svinja utvrđen je gen *dfrA1*, dok je gen *dfrA17* nađen kod dva izolata od svinja.

Slične rezultate o distribuciji *dfr* gena objavili su istraživači iz Litvanije. Kod izolata *E. coli* od obolelih svinja najzastupljeniji je bio gen *dfrA8*, potom *dfrA1* i *dfrA14*, dok je kod

obolelih goveda najzastupljeniji gen bio *dfrA1* i *dfrA14*. Kod izolata *E. coli* iz urina ljudi najzastupljeniji je bio gen *dfrA17* i potom *dfrA1* (Seputiené i sar., 2010).

Distribucija specifičnih *dfr* gena zavisi od geografskog područja odnosno regiona. Geni *dfrA1* su najzastupljeniji u Irskoj i Ujedinjenom kraljevstvu, geni *dfrA5* u Portugaliji i Španiji, *dfrA7* i *dfrA12* u Kanadi, a *dfrA17* u Grčkoj (Blahna i sar., 2006). U Koreji i Australiji su najzastupljeniji *dfrA12* i *dfrA17* genske kasete (White i sar., 2001; Yu i sar., 2004). Kod izolata *E. coli* od ljudi koji su bolovali od infekcija urinarnog trakta, od životinja koje se koriste za proizvodnju hrane i zdravih volontera u Kini, najzastupljeniji su geni *dfrA17* i *dfrA1*. Ovi geni su nađeni na integronima zajedno sa *aadA* genskim kasetama (Ho i sar., 2009).

6.8. Rezistencija na tetracikline

Rezistencija na tetracikline nastaje zahvaljujući *tet* genima koji kodiraju proteine efluksne pumpe kojima bakterija izbacuje tetracikline van ćelije. Efluksni proteini izmenjuju proton za tetraciklin-magnezijum kompleks, koji se vezuje za gen represor čime se aktivira operator i dolazi do konstitutivne ekspresije *tet* gena. Efluksni proteini su podeljeni u šest grupa od kojih je grupa 1 najzastupljenija (Hillen i Berens, 1994; Chopra i Roberts, 2001).

U našim istraživanjima detektovani su *tet* geni koji kodiraju efluksne proteine grupe 1 kod svih ispitujućih izolata *E. coli*. Kod 11 izolata je detektovan *tetA* gen, kod 10 izolata *tetB* gen, a kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje detektovana su oba gena (*tetA* i *tetB*).

Urumova i saradnici su 2016. godine objavili rezultate istraživanja rezistencije *E. coli* iz fekalnih briseva svinja na tetracikline u Bugarskoj. Gen *tetA* je bio zastupljen kod 96,4% ispitanih izolata *E. coli*, dok je gen *tetB* detektovan samo kod 4,6% izolata. Kombinacija *tetA* i *tetB* gena nije detektovana (Urumova, 2016). Njihovi rezultati se razlikuju od naših jer je zastupljenost *tetA* i *tetB* gena u našim istraživanjima ujednačena, a jedan izolat *E. coli* (6S-13) ima oba gena. Grupa istraživača je 2017. godine objavila rezultate istraživanja rezistencije *E. coli* na tetracikline kod teladi i prasadi u Rumuniji. Pored *tetA* i *tetB* gena koji kodiraju efluksne proteine detektovan je i gen *tetC* (Chirila i sar., 2017).

6.9. Konjugabilni plazmidi

Horizontalni transfer gena u prirodi je jedan od najvećih globalnih problema u medicini. Geni za rezistenciju na antibiotike prenose se preko konjugabilnih plazmida. Na rezistentim plazmidima mogu da budu i geni za virulenciju koji u nepovoljnim okolnostima aktiviraju razne mehanizme koji bakterijama pomažu da opstanu u nepovoljnim uslovima. Bakterije koje poseduju gene za virulenciju mogu da dovedu do pojave oboljenja, a one koje imaju gene za rezistenciju, omogućavaju njihovo preživljavanje u prisustvu antibiotika.

Naša istraživanja su prva istraživanja mobilnih genetičkih elemenata kod bakterije *E. coli* u Srbiji. Konjugabilni plazmidi su dokazani kod 16 izolata *E. coli* i to kod devet izolata poreklom od svinja i sedam izolata iz mleka krava. Dokazali smo da se na farmama mlečnih krava i svinja nalaze izolati *E. coli* koji su multirezistentni i imaju veliki broj gena za rezistenciju na konjugabilnim plazmidima. Najviše je bila zastupljena rezistencija na ampicilin (beta-laktame), a *bla*_{TEM-1} gen dokazan je kod 14 od 16 transkonjuganata. Takođe, naši rezultati pokazuju da se preko plazmida prenosi rezistencija na sulfonamide, hloramfenikol, gentamicin, tetracikline i trimetoprim.

Jedan izolat *E. coli* poreklom od svinje (7M-14) je posedovao konjugabilni plazmid sa *bla*_{CTX-M-1} genom, odgovornim za rezistenciju na treću generaciju cefalosporina. Ipak treba da napomenemo da naša istraživanja nisu bila usmerena isključivo na otkrivanje rezistencije na cefalosporine i takođe da broj izolata u istraživanju nije bio reprezentativan za detekciju bakterija koje produkuju ESBL. Potrebno je da se u našoj zemlji izvrše ispitivanja zastupljenosti bakterija koje produkuju ESBL na ciljnim selektivnim podlogama sa antibiotikom (u podlogu McConkey se dodaje 1 mg/L cefotaksima, kod selekcije bakterija koje produkuju ESBL) i kod pozitivnih izolata identifikuju geni za rezistenciju metodom PCR i sekvenciranjem (EFSA, Journal, 2017).

Rasprostranjenost *E. coli* sa *bla*_{CTX-M} genima veoma zabrinjava, posebno zbog toga što jedan broj izolata pored toga što poseduje CTX-M15 enzim na plazmidima (jedan od varijantnih CTX-M enzima koji je veoma rasprostranjen u Evropi), takođe može da poseduje i rezistenciju na fluorohinolone (Dierikx i sar., 2012; Pitout i Laupland, 2008). U našim istraživanjima je dokazano da izolat 7S-13 poseduje CTX-M grupe 1 i ima visoku rezistenciju na ciprofloksacin

(MIK >128 mg/L). Kod ovog izolata *E. coli* nađene su dve mutacije na *gyrA* genu i po jedna mutacija na *parC* i *parE* genu što objašnjava visoku rezistenciju na ciprofloksacin.

Do danas je najpoznatija klonalna ekspanzija *E. coli* ST131 koji su rezistentni na fluorohinolone i takođe produkuju enzim CTX-M-15 (Pitout i DeVinney, 2017). Iz tih razloga je potrebno da se u istraživanjima zastupljenosti bakterija koje produkuju ESBL kod životinja obavezno utvrdi i pojava rezistencije na ciprofloksacin. Fluorohinoloni i cefalosporini proširenog spektra delovanja spadaju u grupu antibiotika od kritičnog značaja u humanoj medicini. Zahvaljujući tome što bakterije mogu da razviju rezistenciju na sve antibiotike koji su do danas komercijalno dostupni i da geni za rezistenciju mogu da se efikasno diseminiraju u životnoj sredini preko plazmida, posebna pažnja treba da bude usmerena na identifikaciju multirezistentih bakterija i u humanoj i u veterinarskoj medicini.

6.10. Integroni

Integroni su specifični genetički elementi koje bakterija koristi za ugradnju ili isecanje genskih kaset. Genske kasete su mali cirkularni molekuli DNK veličine od 500 do 1000 bp koji nemaju sposobnost replikacije, a u integrone se ugrađuju zahvaljujući sekvenci od 59 baznih parova preko *attI* mesta za rekombinaciju. Rekombinacija se odigrava preko enzima integraze (IntI) koju kodira gen *intI*. Integron takođe sadrži promotor koji je neophodan za ekspresiju genske kasete. Samim tim genska kasete van integrona nije funkcionalna i tek posle ugradnje u integron gen za rezistenciju može da se aktivira (Bennett, 1999).

Do danas su poznate tri klase integrona. Integroni klase 1 su najrasprostranjeniji genetički elementi kod kliničkih izolata bakterija, sledeće mesto po učestalosti pripada integronima klase 2, a najmanje su zastupljeni integroni klase 3. Integroni klase 1 su nađeni na mnogobrojnim plazmidima i transpozonima kao i na hromozomu bakterija. Ugradnja i isecanje genskih kasete je nasumični proces kod bakterija. Ukoliko se bakterije nađu u blizini antibiotika, selektovaće se klonovi sa genima za rezistenciju, što doprinosi da se rezistentne bakterije lakše održe u životnoj sredini, pogotovo u nepovoljnim uslovima (Bennett, 1999).

Integroni sa jednom ili više genskih kasete su nađeni kod 12 izolata *E. coli* u našim istraživanjima. Kod izolata 1M-13 u integronu klase 1 nađene su *aadA2-linF* genske kasete. Kombinacija dve genske kasete u ampliconu veličine 1,9 bp nađena je prvi put kod jednog

izolata *E. coli* od pacijenta iz Malezije (Kor i sar., 2013). Kombinaciju genskih kaset *aadA1-sat2* su prvi put ustanovili Schwarz i Kadlec 2008. godine kod izolata *E. coli* od bolesnih životinja (svinja, konja, pasa i mačaka) u Nemačkoj. Gen *sat2* kodira rezistenciju na antibiotik streptotricin koji nikada nije korišćen u Zapadnoj Nemačkoj, ali je krajem 1980. korišćen u Istočnoj Nemačkoj kao promotor rasta (Kadlec i Schwarz, 2008). Isti antibiotik nije ni u Srbiji nikada korišćen, ali se pojava gena *sat2* objašnjava njegovom ko-lokalizacijom sa genskom kasetom *aadA1* koja kodira enzim aminoglikozid adenililtransferazu i uzrokuje rezistenciju na streptomycin/spektinomycin, a locirana je na konjugabilnim plazmidima i/ili integronima. Iako je u istraživanjima Schwarz i Kadlec (2008) veliki broj integrona nađen na konjugabilnim plazmidima, u našem istraživanju ni jedan konjugabilni plazmid nije posedovao *int1* i *int2* gene niti integrone klase 1 i 2.

Genske kasete su identifikovane kod izolata *E. coli* od životinja i ljudi u Iranu. Najzasutpljenija kasete je bila *dfrA1*, kod četiri izolata *E. coli* od živine i po jednog izolata od goveda i ljudi. Nađene su i kombinacije genskih kaset: *dfA17-aadA1*, *aadA1-aadB* i *dfA12-orfF-aadA2*. U integronu 2 nađena je kombinacija genskih kaset *dfrA1-sat2-aadA1*, *dfrA1-sat1-aadA1* i *at-sat1-aadA1*, kod četiri izolata *E. coli*, što govori o interkontinentalnoj diseminaciji gena *sat1* i *sat2* preko integrona klase 2, (Kheiri i Akhtari, 2016). Genske kasete *aadA1-dfrA1* najčešće su bile zastupljene na integronima klase 1 kod izolata avijarne patogene *E. coli* od živine u Egiptu (kod sedam izolata), a u integronima klase 2 nađena je kombinacija genskih kaset *dfrA1-sat2-aadA1* kod četiri izolata (Awad i sar., 2016). Genske kasete *dfrA1-sat2-aadA30* su nađene u integronima klase 2 kod tri izolata *E. coli* od pasa sa urinarnim infekcijama u Brazilu (Siqueira i sar., 2016). Globalna raširenost integrona sa različitim kombinacijama genskih kaset pripisuje se ne samo njihovoj lokalizaciji na konjugabilnim plazmidima nego i na hromozomu bakterija obzirom da integroni sami po sebi predstavljaju mobilne genetičke elemente (Ochman i sar., 2000).

Istraživanja su pokazala da multirezistentne bakterije egzistiraju u različitim ekološkim nišama i da poseduju mogućnost transmisije sa jednog domaćina na drugog ili u životnoj sredini. U skorije vreme najupečatljiviji pimer transmisije je *Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin-MRSA (klon MLST-398) sa životinja na ljude i pojava bakterija familije *Enterobacteriaceae* rezistentnih na karbapeneme i kod ljudi i kod životinja implicira da bakterije

koje mogu da prelaze sa jednog domaćina na drugog poseduju specifične genetičke elemente poput gena za virulenciju i gena za rezistenciju na antibiotike. Diseminacija i transmisija multirezistentnih bakterija može da se predupredi jedino putem sveobuhvatnog monitoringa koji bi podrazmevao i identifikaciju njihovih specifičnih genetičkih elemenata s ciljem prevencije porasta multirezistentnih bakterija u životnoj sredini (Köck i sar., 2017).

Naša istraživanja su prva detaljna istraživanja mehanizama rezistencije *E. coli* u Republici Srbiji. Svih 22 ispitana izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava sa kliničkim mastitisom i od svinja sa dijarejom su imala multirezistentni fenotip. Dokazano je prisustvo gena rezistencije na hromozomu bakterija, ali i na plazmidima kao i prisustvo konjugabilnih plazmida i mobilnih genetičkih elemenata (integrona i genskih kaseti). Kod velikog broja izolata nađena je rezistencija na važne klase antibiotika (fluorohinoloni, cefalosporini proširenog spektra delovanja i gentamicin) koji se koriste u humanoj medicini što je veoma zabrinjavajuće. Prekomerna upotreba antibiotika u stočarstvu u Srbiji, a posebno fluorohinolona je razlog što je izuzetno visoka rezistencija na ciprofloksacin kod izolata *E. coli* poreklom od svinja i iz mleka krava.

Istraživanja u oblasti antimikrobne rezistencije doprinose boljem razumevanju nastanka rezistencije, njenom prenošenju između bakterija i održavanju u prirodi. Indikatorska *E. coli* je jedan od glavnih pokazatelja rezistencije u životnoj sredini. Zato se praćenje rezistencije indikatorske *E. coli* sprovodi u celom svetu u okviru obaveznog monitoringa, a izučavanje mehanizama rezistencije bakterija determinacijom gena rezistencije i mobilnih genetičkih elemenata kao i mogućnosti prenošenja gena rezistencije preko plazmida. Smatramo da rezultati naših istraživanja predstavljaju značajan doprinos izučavanju antimikrobne rezistencije u Republici Srbiji i otvaraju mnogobrojna pitanja za buduća istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

Iz naših istraživanja mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Kod sojeva *E. coli* poreklom sa farmi i gazdinstva goveda i svinja sa teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine ustanovljena je široka rasprostranjenost multirezistencije.
2. Kod 22 reprezentativna soja *E. coli* sa istog broja farmi i gazdinstava utvrđena je kod 100% ispitanih izolata rezistencija na streptomycin i tetraciklin, 95.5% na suflonamide, 77.3% na ampicilin, 59.1% na nalidiksinsku kiselinu, 54.5% na trimetoprim i trimetoprim/sulfametoksazol, 50% na hloramfenikol, 40.1% na ciprofloksacin, 31.8% na gentamicin, 9.1% na cefpodoksim i cefotaksim, kao i 4.5% na ceftazidim.
3. Poređenjem dobijenih rezultata ispitivanja osetljivosti izolata *E. coli* disk difuzionom metodom i mikrodilucionom metodom u bujonu utvrđena je njihova izuzetno visoka podudarnost.
4. PCR metodom utvrđeno je da 17 izolata *E. coli* poreklom od krava i svinja pripadalo filogenetskoj grupi A, a tri izolata grupi B1, grupama u koje spadaju uglavnom komensalni sojevi. Filogenetskoj grupi D u koju spadaju potencijalni ekstraintestinalni sojevi pripadalo je dva izolata, a nijedan izolat nije spadao u filogenetsku grupu B2 ekstraintestinalnih sojeva *E. coli*.
5. Metodama elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD) utvrđeno je da izolati *E. coli* nisu genetički srodni, odnosno imali su različite makrorestriktivne i RAPD profile.
6. PCR metodom kod ispitanih izolata *E. coli* utvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na 14 antibiotika. Najzastupljeniji geni su bili *strA* i *strB* kod 17 izolata, zatim *bla*_{TEM-1} kod 16 izolata, kao i *tetA* i *tetB* kod 11 izolata. Genske kasete *aadA1* i *aadA2* imalo je 11 izolata *E. coli*, i to *aadA1* pet izolata, *aadA2* jedan izolat, dok je kombinaciju oba gena imalo pet izolata. Kod sedam izolata otkriveni su *sul2* geni, kod pet izolata *sul1* geni, kod šest izolata kombinacija *sul1* i *sul2*, a kod dva izolata kombinacija *sul2* i *sul3*. Geni koji kodiraju dihidrofolat reduktazu (*dfrA1*) nađeni su kod četiri izolata, *dfrA5-14* kod četiri izolata, *dfrA7-17* kod dva izolata i *dfrA12* kod jednog

izolata. Geni koji kodiraju rezistenciju na hloramfenikol (*cat*, *cmlA* i *floR*) nađeni su kod četiri izolata (*cat* gen), kod šest izolata *floR* gen i kod jednog izolata *cmlA* gen.

7. Rezistencija na prošireni spektar beta-laktamskih antibiotika kodirana *bla*_{CTX-M-1} genom nađena je kod dva izolata *E. coli*, i to kod jednog iz mleka krave sa mastitisom i drugog poreklom od svinje. Geni *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M8-25} nađeni su kod dva izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava sa mastitisom, ali nije potvrđeno da izolati imaju sposobnost produkcije ESBL.
8. Kod šest izolata *E. coli* utvrđena je rezistencija na aminoglikozide (gentamicin) kodirana *aac(3)-II* genom.
9. Kod pet izolata *E. coli*, tri poreklom od krava a dva od svinja, nađene su četiri mutacije na genima giraze A i topoizomeraze IV, i to dve mutacije na *gyrA* genu i po jedna mutacija na *parC* i *parE* genima. Četiri izolata poreklom od svinja imali su tri mutacije i to dve na *gyrA* genu i po jednu mutaciju na *parC* genu, a četiri izolata mutaciju samo na *gyrA* genu.
10. Kod jednog izolata *E. coli* iz mleka i kod jednog izolata poreklom od svinje ustanovljen je gen *aac6'Ib-cr* koji kodira rezistenciju na hinolone i aminoglikozide, a lociran je na plazmidu. Kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje pronadjen je gen *qnrS* koji kodira rezistenciju na hinolone, takođe sa plazmida.
11. Kod 14 izolata *E. coli* otkriveno je prisustvo integraze 1, a kod dva izolata integraze 2. Kod 12 izolata *E. coli* ustanovljeni su integroni klase 1, a kod jednog izolata nađen je i integron klase 2 u kombinaciji sa integronom klase 1.
12. U integronima klase 1 kod dva izolata *E. coli* nađena je genska kasetta *aadA1*, kod četiri izolata genske kasette *drfA17-aadA5*, a kod tri izolata genske kasette *dfrA1-aadA1*. Kod jednog izolata *E. coli* iz mleka krava nađene su genske kasette *aadA2-linF*. Genska kasetta *aadA23* pronadjena je kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje, a kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje na integronu 1 je detektovana genska kasetta *aadA23*, a na integronu 2 su nađene kasette *aadA1-sat2*.
13. Svih 22 izolata *E. coli* poreklom od goveda i svinja posedovali su plazmide. Prisustvo konjugabilnih plazmida je potvrđeno kod 16 izolata *E. coli*, odnosno kod 72,73%, a kod 10 izolata, odnosno kod 45.45%, nađeni su multirezistentni konjugabilni plazmidi sa

genima rezistencije na tri i više antibiotika. Integroni klase 1 i 2 nisu dokazani na konjugabilnim plazmidima.

14. Dobijeni rezultati prevalencije rezistencije, prisustva mnogobrojnih gena rezistencije na antibiotike, kako u hromozomu tako u plazmidima uključujući i konjugabilne, kao i integraza, integrona i genskih kasete jasno potvrđuju značaj *E.coli* po zdravlje životinja i ljudi usled pojave infekcija rezistentnim sojevima i transfera gena rezistencije poreklom od životinja u bakterije patogene za ljude.

8. SPISAK LITERATURE

1. Alekshun, M.N., Levy, S.B. (1999), "Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro", *Journal of Bacteriology*, Vol. 181, pp. 4669–4672.
2. Andraud, M., Rose, N., Laurentie, M., Sanders, P., Le Roux, A., Cariolet, R., Chauvin, C., Jouy, E. (2011), "Estimation of transmission parameters of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strain between pigs in experimental conditions", *Veterinary Research*, Vol. 42 No. 1, p. 44.
3. Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L. (2004), "Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 54 No. 2, pp. 429–434.
4. Ašanin, R., Krnjaić, D., Nenad, M. (2006), *Priručnik sa praktičnim vežbama iz mikrobiologije sa imunologijom*, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
5. Awad, A., Arafat, N., Elhadidy, M. (2016), "Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 15 No. 59, pp. 1-8.
6. Bennett, P.M. (1999), "Integrations and gene cassettes: A genetic construction kit for bacteria", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 43 No. 1, pp. 1–4.
7. Bennett, P.M. (2008), "Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria", *British Journal of Pharmacology*, Vol. 153, pp. 347–357.
8. Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M. (2017), "Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 72 No. 8, pp. 2145–2155.
9. Bilic, V., Habrun, B., Humski, A. (1999), "Sensitivity of bacteria isolated from pigs.", *Praxis Veterinaria (Zagreb)*, Vol. 47 No. 1/2, pp. 39–46.
10. Blahna, M.T., Zalewski, C.A., Reuer, J., Kahlmeter, G., Foxman, B., Marrs, C.F. (2006), "The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, No. 57, pp. 666–672.
11. Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De Mendonca, R., Rodriguez-Villalobos, H., Struelens, M., Glupczynski, Y. (2007), "Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 59 No. 3, pp. 459–464.
12. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. (2003), "Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors", *Veterinary Research*, Vol. 34, No. 5, pp. 521-564.
13. Bush, K., Jacoby, G.A. (2010), "Updated functional classification of β -lactamases", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 54, No. 3, pp. 967-976.
14. Carattoli, A. (2013), "Plasmids and the spread of resistance", *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 303, No. 6-7, pp 298-304.

15. Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M. (2009), “*qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53 No. 2, pp. 603–608.
16. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P. (2015), “Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be?”, *Evolutionary Applications*, Vol. 8 No. 3, pp. 240–247.
17. Chirila, F., Tabaran, A., Fit, N., Nadas, G., Mihaiu, M., Tabaran, F., Cătoi, C., Reget, O.L., Dan, S.D. (2017), “Concerning increase in antimicrobial resistance in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from young animals during 1980–2016”, *Microbes and Environments*, Vol. 32 No. 3, pp. 252–259.
18. Chong, Y., Ito, Y., Kamimura, T. (2011), “Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*”, *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 11, No. 7, pp. 1499-1504.
19. Chopra, I., Roberts, M. (2001), “Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 65 No. 2, pp. 232–260.
20. Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000), “Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 10, pp. 4555–4558.
21. Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur E. (2011), “Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds”, *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 11 No. 3, pp. 654–662.
22. CLSI. (2015a), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard-tenth edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI Document M100-S25.
23. CLSI. (2015b), Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-twelfth edition, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI Document M007-A10.
24. Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C. (2006), “Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 58, No. 6, pp. 1311-1312.
25. Cullor, J.S., Smith, W.L. (1996), “Endotoxin and disease in food animals”, *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, Vol. 18, pp. 31–38.
26. Dierikx, C.M., van Duijkeren, E., Schoormans, A.H.W., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X.W., van der Zwaluw, K., Wagenaar, J.A., Mevius D.J. (2012), “Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 67 No. 6, pp. 1368–1374.

27. Dierikx, C.M., van Duijkeren, E., Schoormans, A.H.W., van Essen-Zandbergen A., Veldman K., Kant A., Huijsdens XW., van der Zwaluw K., Wagenaar J.A., Mevius D. J. (2012), "Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase and AmpC producing clinical isolates derived from companion animals and horses", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 67, pp. 1368–1374.
28. Doi, Y., Arakawa, Y. (2007), "16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 45 No. 1, pp. 88–94.
29. Dolejšká, M., Bierošová, B., Kohoutová, L., Literák, I., Čížek, A. (2009), "Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 106, No. 6, pp. 1941–1950.
30. EFSA. (2012), "Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* bacteria transmitted through food 1", *EFSA Journal*, Vol. 10 No. 6, p. 64.
31. EFSA. (2017), "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015", *EFSA Journal*, Vol. 15 No. 2, pp. 1–212.
32. Enne, V.I., Cassar, C., Springs, K., Woodward, M.J., Bennett, P.M. (2008), "A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 278 No. 2, pp. 193–199.
33. Erski-Biljić M., Dobrić Đ. (1998), *Bakteriologija Veterinarske Medicine*, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.
34. Faldynova, M., Pravcova, M., Sisak, F., Havlickova, H., Kolackova, I., Cizek, A., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2003), "Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 47, No. 6, pp. 2002–2005.
35. Francis, D.H. (1999), "Colibacillosis in pigs and its diagnosis", *Swine Health and Production*, Vol. 7, No. 5, pp. 241–244.
36. Francis, D.H. (2002), "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis", *Journal of Swine Health and Production*, Vol. 10 No. 4, pp. 171–175.
37. Frech, G., Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2003), "Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 51, No. 1, pp. 180-182.
38. Freitag, C., Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S. (2017), "Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis", *Veterinary Microbiology*, Vol. 200, pp. 151–156.
39. Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W. (2008), "The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance", *Journal of Bacteriology*, Vol. 190, No. 14, pp. 5095–5100.

40. Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D., Chaslus-Dancla, E. (2000), "Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 44 No. 5, pp. 1223–1228.
41. Gosling, R.J., Clouting, C.S., Randall, L.P., Horton, R.A., Davies, R.H. (2012), "Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain", *Avian Pathology*, Vol. 41 No. 1, pp. 83–89.
42. Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkan, N., Glupczynski, Y., Wieler, H.L., Ewers, C. (2012), "Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia", *PLoS ONE*, Vol. 7, No. 12.
43. Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., Helmuth, R. (2003), "Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 52, No. 3, pp. 489–492.
44. Guerra, B., Soto, S.M., Argelles, J.M., Mendoza, M.C. (2001), "Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45 No. 4, pp. 1305–1308.
45. Habrun, B., Kompes, G., Cvetnic', Z., Špičič', S., Benić', M., Mitak, M. (2010), "Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia.", *Veterinarski Arhiv*, Vol. 80, No. 5, pp. 571–583.
46. Habrun Boris. (2014), *Klinička Veterinarska Bakteriologija, Medicinska naklada i Veterinarski institut, Zagreb.*
47. Hammerum, A.M., Heuer, O.E., Emborg, H.D., Bagger-Skjot, L., Jensen, V.F., Rogues, A.M., Skov, R.L., Agerso, Y., Brandt, T.C., Seyfarth, M.A., Muller A., Hovgaard, K., Ajufo, J., Bager, F., Aarestrup, F., Frimodt-Møller, N., Wegener C.H., Monnet, L.D. (2007), "Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program", *Emerg Infect Dis*, Vol. 13 No. 11, pp. 1632–1639.
48. Hammerum, A.M., Larsen, J., Andersen, V.D., Lester, C.H., Skovgaard Skytte, T.S., Hansen, F., Olsen, S.S., Mordhorst, H., Skov, R.L., Aarestrup, F.M., Agerso Y. (2014), "Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third or fourth-generation cephalosporins", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 69, pp. 2650–2657.
49. Hammerum, A.M., Sandvang, D., Andersen, S.R., Seyfarth, A.M., Porsbo, L.J., Frimodt-Møller, N., Heuer, O.E. (2006), "Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 106, No. 2, pp. 235–237.
50. Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., Sørensen, S.J. (2004), "Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 9, pp. 3332–3337.

51. Hart, W.S., Heuzenroeder, M.W., Barton, M.D. (2004), “Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia”, *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, Vol. 51, No. 5, pp. 216–221.
52. Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S., Sakae, K. (2005), “Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 49, No. 2, pp. 801–803.
53. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Jouy, E., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greco, K., Stark, K., Berghold C., Myllyniemi, A., Hoszowski, A., Sunde, M., Aarestrup F.M. (2008), “Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: The ARBAO-II study”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 50, No. 19.
54. Hillen, W., Berens, C. (1994), “Mechanisms underlying expression of TN10 encoded tetracycline resistance”, *Annual Review of Microbiology*, Vol. 48 No. 1, pp. 345–369.
55. Ho, P.L., Wong, R.C., Chow, K.H., Que, T.L. (2009), “Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals”, *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 49, No. 5, pp. 627–634.
56. Hong, B.K., Wang, M., Chi, H.P., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2009), “*oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53, No. 8, pp. 3582–3584.
57. Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J. (2005), “Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 25, No. 5, pp. 358-373.
58. Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C. (2006), “*qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50, No. 4, pp. 1178–1182.
59. Jakobsen, L., Sandvang, D., Hansen, L.H., Bager-Skjot, L., West, H., Jorgensen, C., Hansen, D.S., Pedersen, M.D., Monnet, L.D., Frimodt-Moller, N., Sorensen, J.S., Hammerum, M.A. (2008), “Characterization, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from Danish university hospital to the waste water environment”, *Environment International*, Vol. 34, pp. 108–115.
60. Jezdimirović B. Milanka. (2005), *Veterinarska Farmakologija*, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
61. Jezdimirović B. Milanka. (2009), *Osnovi farmakoterapije i gotovi veterinarski lekovi*, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
62. Johnson, T.J., Logue, C.M., Wannemuehler, Y., Kariyawasam, S., Doetkott, C., DebRoy, C., White, D.G., Nolan, L.K. (2009), “Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat”, *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 6, No. 6, pp. 657–667.
63. Johnson, T.J., Thorsness, J.L., Anderson, C.P., Lynne, A.M., Foley, S.L., Han, J., Fricke, W.F., McDermott, F.P., White, G.D., Khatri, M., Stell, L.A., Flores, C., Singer, S.R. (2010), “Horizontal gene transfer of a colV plasmid has resulted in a dominant avian clonal type of *Salmonella enterica* serovar Kentucky”, *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 12.

64. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K. (2008), "Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 46, No. 12, pp. 3987–3996.
65. Kadlec, K., Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2007), "Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 59, pp. 191–196.
66. Kadlec, K., Schwarz, S. (2008), "Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 62, No. 3, pp. 469–473.
67. Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N., Fanning, S. (2011), "Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 20, pp. 7121–7127.
68. Kehrenberg, C., Friederichs, S., de Jong, A., Michael, G.B., Schwarz, S. (2006), "Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 58 No. 1, pp. 18–22.
69. Kehrenberg, C., de Jong, A., Friederichs, S., Cloeckert, A., Schwarz, S. (2007), "Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 59, No. 5, pp. 886–892.
70. Kehrenberg, C., Schwarz, S. (2001), "Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 205, No. 2, pp. 283–290.
71. Kehrenberg, C., Werckenthin, C., Schwarz, S. (1998), "Tn5706, a transposon-like element from *Pasteurella Multocida* mediating tetracycline resistance", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 42, No. 8, pp. 2116–2118.
72. Kheiri, R. and Akhtari, L. (2016), "Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI", *Gut Pathogens*, Vol. 8, No. 1.
73. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K., Takahashi, T., Tamura, Y. (2003), "A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan.", *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 51, No. 2, pp. 447–451.
74. Kikvi, G.M., Schwarz, S., Ombui, J.N., Mitema, E.S., Kehrenberg, C. (2007), "Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya", *Microbial Drug Resistance*, Vol. 13, No. 1, pp. 62–68.
75. Knezevic, P., Petrovic, O. (2008), "Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia", *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 31, No. 4, pp. 360–363.

76. Köck, R., Kreienbrock, L., van Duijkeren, E., Schwarz, S. (2017), "Antimicrobial resistance at the interface of human and veterinary medicine", *Veterinary Microbiology*, Vol. 200, pp. 1–5.
77. Kor, S.B., Choo, Q.C., Chew, C.H. (2013), "New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals in Malaysia", *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 62, No. 3, pp. 412–420.
78. Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S. (2000), "Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 44, No. 12, pp. 3249–3256.
79. Krnjaić, D. (2000), Ispitivanje rezistencije bakterija izolovanih od domaćih životinja prema hemoterapijskim sredstvima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
80. Krnjaić, D., Mišić, D., Ašanin, R. (2005), "Investigation of sensitivity and resistance to antibiotics and chemotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions", *Acta Veterinaria*, Vol. 55, No. 5–6, pp. 501–509.
81. Lago, A., Godden, S.M., Bey, R., Ruegg, P.L., Leslie, K. (2011), "The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes", *Journal of Dairy Science*, Vol. 94 No. 9, pp. 4441–4456.
82. Lautenbach, E., Fishman, N.O., Metlay, J.P., Mao, X., Bilker, W.B., Tolomeo, P., Nachamkin, I. (2006), "Phenotypic and genotypic characterization of fecal *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolones: results from a large hospital based surveillance initiative", *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 194, No. 1, pp. 79–85.
83. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P.H. (1995), "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39, No. 1, pp. 185–191.
84. Levy, S.B., Marshal, B. (2004), "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses", *Nature Medicine*, Vol. 10, No. 12, pp. 122–129.
85. Luppi, A. (2017), "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance", *Porcine Health Management*, Vol. 3, No. 1, p. 16.
86. Marks, S.L., Rankin, S.C., Byrne, B.A., Weese, J.S. (2011), "Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control", *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 25, No. 6, pp. 1195–1208.
87. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., García, I., Tran, J., Jacoby, G.A. (2003), "Interaction of plasmid and host quinolone resistance", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 51, No. 4, pp. 1037–1039.
88. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A. (1998), "Quinolone resistance from a transferable plasmid", *Lancet*, Vol. 351, No. 9105, pp. 797–799.
89. McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyes, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A., Stelma, G.N. (1996), "Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 9, pp. 3350–3354.

90. Michael, G.B., Kaspar, H., Siqueira, A.K., de Freitas Costa, E., Corbellini, L.G., Kadlec, K., Schwarz, S. (2017), "Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014", *Veterinary Microbiology*, Vol. 200, pp. 142–150.
91. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M., Souod, N. (2013), "Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 12, No. 1.
92. Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M. (2001), "Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes", *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 15, No. 4, pp. 209–215.
93. Ochman, H., Lawrence, J.G., Grolsman, E.A. (2000), "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation", *Nature*, Vol. 405, No. 6784, pp. 299-304.
94. Oram, M., Fisher, L.M. (1991), "4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 35, No. 2, pp. 387–389.
95. Pacheco, A.B.F., Guth, B.E.C., Soares, K.C.C., Nishimura, L., De Almeida, D.F., Ferreira, L.C.S. (1997), "Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 6, pp. 1521–1525.
96. Palzkill, T. (2013), "Metallo- β -lactamase structure and function", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1277, No. 1, pp. 91–104.
97. Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005), "Extended-Spectrum beta-Lactamases: a clinical update", *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 18, No. 4, pp. 657–686.
98. Perreten, V., Boerlin, P. (2003), "A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 47, No. 3, pp. 1169–1172.
99. Piddock, L.J. V. (2002), "Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals", *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 26, No. 1, pp. 3–16.
100. Pitout, J.D., Laupland, K.B. (2008), "Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern", *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 8, No. 3, pp. 159-166.
101. Pitout, J.D., DeVinney, R. (2017), "*Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination", *F1000Research*, Vol. 6, p. 195.
102. Pitout, J.D., Hamilton, N., Church, D.L., Nordmann, P., Poirel, L. (2007), "Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in *Enterobacteriaceae*", *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 13, No. 3, pp. 291–297.
103. Prüller, S., Rensch, U., Meemken, D., Kaspar, H., Kopp, P.A., Klein, G., Kehrenberg, C. (2015), "Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes", *PLoS ONE*, Vol. 10, No. 8.
104. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S., FitzPatrick, E.S. (2011), *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, John Wiley and Sons Ltd, Chicester, United Kingdom.
105. Richardson, L.A. (2017), "Understanding and overcoming antibiotic resistance", *PLoS Biology*, Vol. 18, No. 8.

106. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Chi, H.P., Bush, K., Hooper, D.C. (2006), "Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase", *Nature Medicine*, Vol. 12, No. 1, pp. 83–88.
107. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K. (2005), "Characterizing the APEC pathotype", *Veterinary Research*, Vol. 36, No. 2, pp. 241–256.
108. Rodriguez-Villalobos, H., Malaviolle, V., Frankard, J., de Mendonça, R., Nonhoff, C., Struelens, M.J. (2006), "In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 57, No. 4, pp. 771–774.
109. Rosengren, L.B., Waldner, C.L., Reid-Smith, R.J., Checkley, S.L., McFall, M.E., Rajić, A. (2008), "Antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* isolated from grow-finish pigs in 20 herds in Alberta and Saskatchewan", *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 72, No. 2 SPEC. ISS., pp. 160–167.
110. Ruiz, J., Casellas, S., Jimenez de Anta, M.T., Vila, J. (1997), "The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 39, No. 6, pp. 839–840.
111. Rupp, M.E., Fey, P.D. (2003), "Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*", *Drugs*, Vol. 4, pp. 353–365.
112. Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. (2004), "Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 10, pp. 3996–4001.
113. Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (2008), *Diseases of Poultry*, edited by Saif, Y.M., Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa 50014, USA.
114. Sawant, A.A., Hegde, N. V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love, B.C., Knabel, S.J., Jayarao, B.M. (2007), "Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 1, pp. 156–163.
115. Schierack, P., Kadlec, K., Guenther, S., Filter, M., Schwarz, S., Ewers, C., Wieler, L.H. (2009), "Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group.", *Gut Pathogens*, Vol. 1, No. 1, p. 18.
116. Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D.D., McDermott, P.F., Walker, R.D., Meng, J. (2002), "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 2, pp. 576–581.
117. Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A. (2004), "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol", *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 28, No. 5, pp. 519–542.
118. Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van duijkeren, E., Johnson, A.P., Gastra, W. (2010), "Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 65, No. 4, pp. 601–604.

119. Seputienė, V., Povilonis, J., Ruzauskas, M., Pavilonis, A., Suziedėlienė, E. (2010), "Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania.", *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 59, No. 3, pp. 315–322.
120. Siqueira, A.K., Michael, G.B., Domingos, D.F., Ferraz, M.M.G., Ribeiro, M.G., Schwarz, S., Leite, D.S. (2016), "Diversity of class 1 and 2 integrons detected in *Escherichia coli* isolates from diseased and apparently healthy dogs", *Veterinary Microbiology*, Vol. 194, pp. 79–83.
121. Sköld, O. (2000), "Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends", *Drug Resistance Updates*, Vol. 3, No. 3, pp. 155-160.
122. Sköld, O. (2001), "Resistance to trimethoprim and sulfonamides", *Veterinary Research*, Vol. 32, pp. 261–273.
123. Smith, D.K., Kassam, T., Singh, B., Elliott, J.F. (1992), "*Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci", *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, No. 18, pp. 5820–5826.
124. Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. (2009), "Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat", *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 22, No. 4, pp. 649-689.
125. Sunde, M., Norström, M. (2005), "The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 56, No. 1, pp. 87–90.
126. Sunde, M., Norström, M. (2006), "The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products.", *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 58, No. 4, pp. 741–747.
127. Suojala, L., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (2013), "Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 36, No. 6, pp. 521–531.
128. Tamang, M.D., Nam, H.-M., Kim, S.-R., Chae, M.H., Jang, G.-C., Jung, S.-C., Lim, S.-K. (2013), "Prevalence and molecular characterization of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle.", *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 10, No. 1, pp. 13–20.
129. Thorsteinsdóttir, T.R., Haraldsson, G., Fridriksdóttir, V., Kristinsson, K.G., Gunnarsson, E. (2008), "Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland", *Zoonoses and Public Health*, Vol. 57, No. 3, pp. 189–196.
130. Todorović, D., Velhner, M., Milanov, D., Vidanović D., Suvajdžić, Lj., Stojanov, I., Krnjaić, D. (2015), "Characterization of tetracycline resistance of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Infantis* isolated from poultry in the northern part of Serbia", *Acta Veterinaria*, Vol. 65, No. 4, pp. 548–556.
131. Urumova, V. (2016), "Investigations on tetracycline resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from swine", *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 19, No. 3, pp. 179–188.
132. Velhner, M. (2016), "Mechanisms of resistance to quinolones and epidemiological significance of *Salmonella* spp.", *Acta Veterinaria*, Vol. 66, No. 2, pp. 147-159.

133. Velhner, M., Kozoderović, G., Milanov, D., Todorović, D., Suvajdžić, Lj. (2014), “World wide spread of *Salmonella enterica* serotypes, harboring different mechanisms of resistance”, Proceedings, II International Congress Food Technology, Quality and Safety, XVI International Symposium Feed Technology, Novi Sad, 18-20.10.2014, Editors Tea Brlek, Milica, Pojić, Novi Sad, Institute of Food Technology, pp. 593–597.
134. Velhner Maja, Jelena, P., Igor, S., Radomir, R., Dragica, S. (2010), “Mehanizmi prenošenja rezistencije kod bakterija”, Arhiv Veterinarske Medicine, Vol. 3, No. 1, pp. 85–92.
135. Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., De Anta, M.T. (1996), “Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*.”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 40, pp. 491–493.
136. Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., De Anta, T.J. (1994), “Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 38, No. 10, pp. 2477-2479.
137. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C., Wang, M. (2009), “New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 53, No. 5, pp. 1892–1897.
138. White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D. (2001), “Integrans and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 45, No. 9, pp. 2658–2661.
139. Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Jensen, L.B. (2010), “Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human”, Acta Veterinaria Scandinavica, Vol. 52, No. 1, p. 47.
140. Yamane, K., Wachino, J.I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, K., Arakawa, K. (2007), “New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 51, No. 9, pp. 3354–3360.
141. Yang, H., Chen, S., White, D.G., 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, Vol. 42, No. 8, pp. 3483–3489.
142. Yang, S., Clayton, S.R., Zechiedrich, E.L. (2003), “Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*”, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 51, No. 3, pp. 545–556.
143. Yeh, J.-C., Lo, D.-Y., Chang, S.-K., Chou, C.-C., Kuo, H.-C. (2017), “Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in Taiwan”, Journal of veterinary medical science, Vol. 79, No. 4, pp. 730–735.
144. Yousefi, A., Torkan, S. (2017), “Uropathogenic *Escherichia coli* in the urine samples of Iranian dogs: Antimicrobial resistance pattern and distribution of antibiotic resistance genes”, BioMed Research International, Vol. 2017.

145. Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Lee, E.Y., Choi, C.H., Tae, S.H., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T. (2004), "Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 53, No. 3, pp. 445–450.
146. Yue, L., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Li, S.J., Chen, X.Y., Chen, C.X., Lu, D.H., Liu, Y.H. (2008), "Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*", *Veterinary Microbiology*, Vol. 132, No. 3–4, pp. 414–420.

Slika 9.

https://www.google.com/search?q=mechanisam+of+tetracikline+efflux+pump&tbm=isch&tbs=rimg:CSobVvPNc5nqljg8reur5Leb1Ckw4EL3sT-r8j7O4Nkfkbn61RS0mK-N_1rhxBBqM0vKIbq9ZaVjtUwZLYFKIEnTmLioSCTyt66vkt5vUEfrGK8kNaznmKhIJKTDgQvexP6sRtT9qqvDWy40qEgnyPs7g2R-RsxH0ILVzUhgjfSoSCXrVFLSYr43-Ec-gKTrrhJPMKhIJuHEEGozS8ogRCdGgaD6QYAoqEglur1lpWO1TBhHR3GgtV3JpICoSCUtgUogSdOYuEbsS7wcnHAcE&tbo=u&sa=X&ved=2ahUKEwjew6DggPjaAhWFLVAKHZnEBOMQ9C96BAgBEBg&biw=1920&bih=961&dpr=1#imgrc=GTnRKmedGc63QM:)

10. PRILOG 2

SPISAK SKRAĆENICA

A

AAC – aminoglikozid acetiltransferaza
AMC – amoksicilin sa klavulonskom kiselinom
AMP – ampicilin
ANT – aminoglikozid nukleotidiltransferaza
APEK – avijarna patogena *Escherichia coli*
APH – aminoglikozid fosfotransferaza
ATP – adenzinotrifosfat

B

BLAST – basic local alignment search tool

C

CAT – hloramfenikol acetiltransferaza
CAZ – ceftazidim
CHL – hloramfenikol
CIP – ciprofloksacin
CLSI – Institut za klinička i laboratorijska ispitivanja
CPD – cefpodoksim
CTX – cefotaksim

D

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DHFR – dihidrofolat reduktaza
DPHS – dihidropteroat sintetaza

E

ECOF – epidemiološka granična vrednost
EFSA – Evropska agencija za bezbednost hrane
ESBL – prošireni spektar β -laktamaza
EU – Evropska unija
EUCAST – Evropski komitet za ispitivanje antimikrobne osetljivosti

F

FLO – florfenikol

G

GAD – glutamat dekarboksilaza
GEN – gentamicin

J

JVARM – Japanski veterinarski sistem za nadzor antimikrobne rezistencije

L

LB – Luria Bertani

M

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MLST – multilocus sequence typing

MRSA – meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*

N

NAL – nalidiksinska kiselina

P

PABA – paraaminobenzoična kiselina

PCR – lančana reakcija polimeraze

PFGE – elektroforeza u pulsnom polju

PMQR – plasmid mediate quinolones resistance

R

RAPD – nasumična amplifikacija polimorfne DNK

RND

RNK – ribonukleinska kiselina

rRNK – ribozomska ribonukleinska kiselina

S

SA – sulfonamide

SAD – Sjedinjene Američke Države

STR – streptomycin

SXT – trimetoprim/sulfametoksazol

T

TET – tetraciklin

TMP – trimetoprim

tRNK – transportna ribonukleinska kiselina

U

UK – Ujedinjeno Kraljevstvo

Q

QRDR – quinolone resistance determining region

BIOGRAFIJA AUTORA

Dalibor Todorović je rođen u Raški 04.06.1987. godine. Osnovnu školu "Sutjeska" u Raški završio je 2002. godine sa odličnim uspehom. Srednju Poljoprivrednu školu "Priština", obrazovnog profila veterinarski tehničar završio je 2006. godine u Leposaviću sa odličnim uspehom.

Diplomu doktora veterinarske medicine je stekao na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,56. Master rad je odbranio 2013. godine pod nazivom *"Značaj pojedinačnog uzorkovanja mleka u cilju otkrivanja krava sa poremećenom sekrecijom vimena"* na istom fakultetu. Doktorske studije je upisao oktobra 2013. godine na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene studijskim programom doktorskih akademskih studija sa prosečnom ocenom 9,20.

Od maja 2013. godine zapošljen je na Odeljenju za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju, Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu. U zvanje istraživača pripravnika izabran je 2014. godine, a u zvanje istraživača saradnika 2017. godine. Kao autor i koautor objavio je preko 30 naučnih radova od kojih su 5 od međunarodnog značaja.

Živi u Novom Sadu sa suprugom Ivanom i ćerkom Lenkom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Далибор Тодоровић

број уписа: 15/16

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Карактеризација механизма резистенције на антибиотике и молекуларна типизација изолата *Escherichia coli* пореклом од говеда и свиња"

- 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 користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Далибор Тодоровић

Број уписа: 15/16

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: "Карактеризација механизма резистенције на антибиотике и молекуларна типизација изолата *Escherichia coli* пореклом од говеда и свиња"

Ментори: Проф. др Дејан Крњић, Др Маја Велхнер

Потписани: Далибор Тодоровић

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

"Карактеризација механизма резистенције на антибиотике и молекуларна типизација изолата *Escherichia coli* пореклом од говеда и свиња"

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, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.