

Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Matea Musa

**Mehanizmi stjecanja otpornosti na antibiotike  
kod bakterija**

**Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria**

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2017.

## SAŽETAK

Antibiotici su jedni od najuspješnijih lijekova diljem svijeta, ali njihova učestala upotreba dovela je do razvitka rezistencije koja ugrožava liječenje raznih bolesti. Kada nastupi rezistencija, primijenjena količina antibiotika nije dovoljna za suzbijanje bakterija. One mogu biti prirodno otporne ili rezistenciju mogu steći naknadno. Bakterije su razvile mnogobrojne mehanizme otpornosti što je dovelo do povećanja stope smrtnosti i morbiditeta. Brzim širenjem rezistencije kod bakterija i nedovoljnim razvitkom novih antibiotika moglo bi doći do znatno velike krize u liječenju raznovrsnih bolesti.

Ključne riječi: antibiotik, bakterije, rezistencija

## ABSTRACT

Antibiotics are among the most potent drugs around the world. However, their frequent use has also led to the development of resistance that endangers the treatment of various diseases. When resistance occurs, the amount of antibiotic that is applied is not sufficient to eliminate the bacteria. This resistance can be primary or it can be acquired later. Bacteria have developed several mechanisms of resistance that have led to the increase in mortality and morbidity rates. Rapid expansion of bacterial resistance and insufficient development of new antibiotics could lead to a major crisis in the treatment of various diseases.

Key words: antibiotics, bacteria, resistance

## SADRŽAJ

1.0.	UVOD .....	1
2.0.	ANTIBIOTICI.....	2
2.1.	Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterije .....	3
2.2.	Pogrešna primjena antibiotika .....	4
3.0.	REZISTENCIJA.....	5
3.1.	Primarna (urođena ili intrinzična) rezistencija .....	5
3.2.	Sekundarna rezistencija .....	6
3.2.	Mehanizmi sekundarne rezistencije .....	7
3.2.1.	Mehanizmi stjecanja sekundarne rezistencije.....	8
4.0.	MEHANIZMI STJECANJA OTPORNOSTI BAKTERIJA NA POJEDINE SKUPINE ANTIBIOTIKA.....	12
4.1.	Antibiotici koji djeluju na sintezu stanične stijenke.....	12
4.2.	Antibiotici koji djeluju na citoplazmatskoj membrani .....	15
4.2.1.	Polimiksini .....	15
4.3.	Antibiotici koji sprječavaju sintezu proteina.....	15
4.3.1.	Aminoglikozidi.....	15
4.3.2.	Tetraciklini .....	16
4.3.3.	Glicilciklini.....	16
4.3.4.	Kloramfenikol .....	17
4.3.5.	Makrolidi.....	17
4.3.6.	Linkozamidi .....	17
4.4.	Antibiotici koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina .....	18
4.4.1.	Kinoloni.....	18
4.4.2.	Rifamicini.....	18
4.4.3.	Metronidazol .....	19

4.4.4.	Sulfonamidi i trimetoprim .....	19
4.5.	Antituberkulotici.....	20
5.0.	MULTIPLA REZISTENCIJA .....	21
5.1.	Multipla rezistentni organizmi .....	22
6.0.	Detekcija antibiotske otpornosti.....	23
6.1.	Laboratorijska istraživanja .....	23
6.2.	Metode testiranja .....	23
6.2.1.	Metoda razrjeđivanja.....	24
6.2.2.	Disk-difuzijska metoda .....	24
6.2.3.	E-test.....	25
6.2.4.	Automatizirane metode .....	25
6.2.5.	Testovi specifični za mehanizam rezistencije .....	25
6.2.6.	Genotipske metode .....	25
7.0.	ZAKLJUČAK .....	26
8.0.	LITERATURA.....	28

## 1.0. UVOD

Antibiotici su jedni od najčešće upotrebljivanih lijekovi koji baš zbog te činjenice stvaraju veliki problem u medicini. Njihova uspješnost u terapiji ugrožena je sve većim brojem bakterija koje postaju otporne na njihovo djelovanje<sup>2</sup>. Povećanje stope rezistencije na antibiotike dovodi do niza problema kao što su povećanje morbiditeta odnosno oboljenja, smrtnosti, povećanih troškova liječenja, te samim time postaju jednim od najvećih globalnih prijetnji javnom zdravlju<sup>2</sup>. Prema izvješćima World Economic Forum Global Risks antibiotska otpornost predstavljena je kao jedna od najvećih prijetnji ljudima. Procjenjuje se da u Europi 25.000 ljudi umire svake godine kao rezultat bakterija otpornih na lijekove<sup>1</sup>.

Već sredinom 20. st A. Fleming je najavio pojavu rezistencije na penicilin. Danas je otkrivena rezistencija na svaki antibiotik, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim činiteljima, ali ponajviše o potrošnji antibiotika<sup>14</sup>. Prvi mehanizam rezistencije na antibiotike opisan je za penicilinazu, odnosno za enzim koji inaktivira penicilin njegovom razgradnjom<sup>15</sup>. O njegovoj prisutnosti i aktivnosti prvi su izvijestili Abraham i Lanac 1940. godine neposredno nakon njegova otkrića. Dva su mehanizma nastanka rezistencije, a to su primarni ili urođeni, te sekundarni ili stečeni gdje je nastala otpornost kodirana s nekoliko gena koji se mogu prenositi među bakterijama<sup>15</sup>. Antibiotici ne razlikuju patogene bakterije od nepatogenih bakterija normalne flore, time dolazi do nakupljanja odnosno skladištenja gena rezistencije u prirodi. Takve rezistentne bakterije postaje teško ili nemoguće liječiti<sup>15</sup>.

Antibiotici su, unatoč velikoj rezistenciji, i dalje presudni lijekovi u medicini gdje njihova upotreba smanjuje smrtnost djece i povećava životni vijek<sup>13</sup>. Novi mehanizmi otpora se konstantno opisuju, te se svakodnevno otkrivaju novi načini prijenosa rezistentnih gena<sup>4</sup>. Zbog nedovoljnog razvitka novih antibiotika i sve veće razine rezistencije mnoge zemlje postale su svjesne tog problema. Na zahtjev Vijeća Europske Unije borba protiv otpornosti na antibiotike ubraja se u prioritete Svjetske zdravstvene organizacije<sup>3</sup>.

## 2.0. ANTIBIOTICI

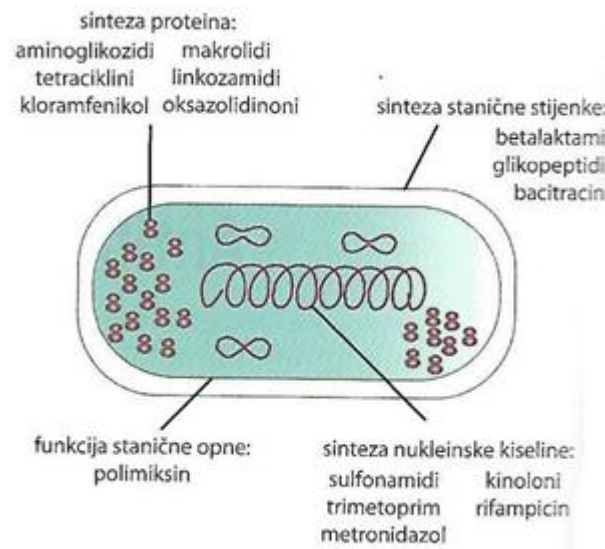
Antibiotici mogu zaustaviti rast ili razvoj patogenih mikroorganizama, te su jedni od najuspješnijih i najčešće upotrebljivanih lijekova<sup>1</sup>. Njihovo glavno obilježje je što su selektivno toksični, odnosno toksični su za bakterije, dok su netoksični za ljudski organizam. Antibiotici potječu prirodnim putem kao produkti bakterija i gljiva ili mogu biti sintetički proizvod<sup>15</sup>. Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterije dijele se na: inhibiciju sinteze bakterijske stanične stijenke (betalaktamski antibiotici), inhibiciju sinteze proteina na ribosomima (aminoglikozidi, tetracikloini i dr.), inhibiciju DNA sinteze (kinoloni, rifampicini i dr.) i djelovanje na funkciju citoplazmatske membrane kao što polimiksini oštećuju citoplazmatsku membranu pri čemu bakterija gubi svojstva osmotske barijere<sup>15</sup>.

Antibiotici se koriste šezdesetak godina, a njihova je masovna primjena započela u Drugom svjetskom ratu. Primjena antibiotika podupire modernu medicinu, njihova upotreba smanjila je smrtnost djece i znatno povećala životni vijek<sup>1</sup>. S obzirom na dugotrajnu primjenu, bakterije su stekle određenu rezistenciju na njihovo djelovanje i zbog toga je učinkovitost antibiotika ugrožena. Otpornost dovodi do povećanja oboljenja i stope smrtnosti<sup>1</sup>. Problem rezistencije bakterija najavio je i Alexander Fleming kada je početkom 40-ih godina 20. stoljeća uveo penicilin u kliničku praksu<sup>14</sup>. Već 1950-ih godina to se pokazalo točnim, jer je tada 60-80% stafilokoka bilo rezistentno na penicilin. 1960-ih godina uvedeni su semisintetski penicilini (metecilin, kloksacilin), a 1990. godine vodila se borba s metecilin-rezistentnim stafilokokom (MRSA)<sup>1</sup>. Danas, sedamdesetak godina kasnije, neučinkovitost antibiotika postao je jedan od glavnih globalnih problema današnje medicine. Procjenjuje se da svake godine u Europi 25000 ljudi umre kao rezultat rezistencije bakterija, a u SAD-u više od 2 milijuna ljudi godišnje zarazi se bakterijama rezistentnim na antibiotike, što uzrokuje smrt 23 000 ljudi<sup>3</sup>. Problem je najočitiiji u bolničkoj flori, gdje terapijski postupci pospješuju razvoj infekcija, a široka upotreba antibiotika pospješuje širenje rezistentnih bakterijskim sojeva. U bolničkoj flori dominira MRSA, enterobakterije otporne na III. generaciju cefalosporina i pseudomonasi rezistentni na karbapenem. MRSA i *Escherichia coli* (koja producira  $\beta$ -laktamaze proširenoga spektra) uzrokuju i izvanbolničke infekcije<sup>3</sup>. No nije jedini problem otpornost na antibiotike već i nedostatak otkrića novih antibiotika koji bi na nov način ubijali bakterijske stanice. Antibiotici su jedini lijekovi koji ne djeluju samo na pojedinca koji ih konzumira, već djeluju i na njegovu okolinu i društvo u cjelini<sup>3</sup>.

## 2.1. Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterije

Antibiotik može djelovati bakteriostatički gdje zaustavlja rast i razmnožavanje bakterije, ali ju ne ubija<sup>15</sup>. Također može djelovati i baktericidno pri čemu antibiotik ubija bakterijsku stanicu. Osim podjele prema mehanizmu djelovanja, antibiotici su još podijeljeni i prema kemijskom sastavu<sup>15</sup>.

Antibiotici djeluju na različita mjesta na bakterijskoj stanici (Slika 1. ). Djeluju na staničnu stijenku bakterije, citoplazmatsku opnu, ribosome i nukleinske kiseline. Na bakterijskoj staničnoj stijenci antibiotici djeluju na sintezu prekursora peptidoglikana, te na formiranje peptidoglikanskoga sloja<sup>15</sup>. Djelovanjem antibiotika na citoplazmatsku opnu dolazi do poremećaja funkcionalne cjelovitosti membrane, čime se može postići selektivna toksičnost jer je sastav citoplazmatske membrane drugačiji kod bakterija i kod ljudi. Treće mjesto djelovanja antibiotika je na ribosomima, gdje dolazi do sprječavanja sinteze proteina, pri čemu je također moguće postići selektivnu toksičnost. Posljednje mjesto djelovanja antibiotika uključuje sprječavanje sinteze nukleinskih kiselina što se pokazalo vrlo učinkovito.<sup>15</sup>



Slika 1. Različita mjesta djelovanja antibiotika na bakteriju <sup>15</sup>



## 2.2. Pogrešna primjena antibiotika

Najveća potrošnja antibiotika uočena je u najsiromašnijim zemljama, čemu je uzrok neprosvijećenost stanovništva<sup>6</sup>. U Hrvatskoj prevelika upotreba antibiotika može se djelom pripisati i nedovoljnoj edukaciji liječnika, koji su prepušteni samo informacijama od farmaceutskih industrija koji predstavljaju samo svijetlu sliku upotrebe antibiotika, a ne cjelokupni problem<sup>17</sup>. Ovaj se problem pokušava diljem Europe smanjiti educiranjem stanovništva putem marketinške kampanje. Česti propusti u primjeni antibiotika uključuju i primjenu empirijske terapije koja se preuzima iz stranih literatura, a ti podaci ne moraju nužno odgovarati sa stanjem rezistencije u Republici Hrvatskoj. 1996. godine osnovan je Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH s ciljem bolje edukacije liječnika. Odbor je, u okviru djelatnosti Interdisciplinarne sekcije za kontrolu rezistencije bakterija na antibiotike (ISKRA), preuzeo obvezu praćenja potrošnje antibiotika u hrvatskim bolnicama<sup>11</sup>. Svake godine odbor daje izvješća za rezistenciju bakterija u pojedinačnim regijama u Hrvatskoj. Europska je komisija 1999. g. pokrenula studije o potrošnji antibiotika i praćenju rezistencije bakterija<sup>17</sup>.

Pet najčešćih pogrešaka u korištenju antibiotika:

- a) Primjena antibiotika za liječenje virusnih infekcija.  
Npr. Kod infekcija gornjih dišnih puteva najčešće se propisuju antibiotici, iako je 90% infekcija virusne etiologije pri čemu su antibiotici nedjelotvorni.
- b) Preduga antibiotska terapija.  
Duga upotreba antibiotika može dovesti do rezistencije, gdje se bakterijski patogen ukloni, ali se među pripadnicima fiziološke flore razvija rezistencija koja se može prenijeti na druge bakterije većeg patogenog potencijala.
- c) Prepisivanje antibiotika u slučajevima nejasnih dijagnoza.  
Često liječnici kada nemaju određenu dijagnozu pacijenta stavljaju na terapiju s malim dozama antibiotika što vrlo lako dovodi do rezistencije.
- d) Izbjegavanje prelaska na antibiotik uskog spektra  
Nakon dobivanja bakteriološkog nalaza liječnici često ne zamjenjuju antibiotik šireg spektra, s antibiotikom užeg spektra koji djeluje na samo štetnu bakteriju ne izazivajući rezistenciju i kod ostalih bakterija. Novi antibiotici su pogodniji za empirijsku terapiju jer je otpornost na njih niža.
- e) Pogrešno tumačenje bakteriološkog nalaza

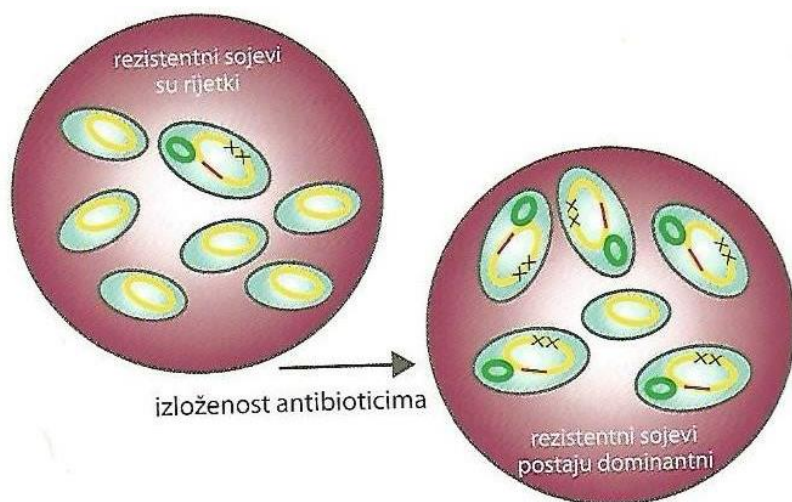
### **3.0. REZISTENCIJA**

Do danas su bakterije razvile mehanizme otpornosti gotovo na sve skupine antibiotika. Kad nastupi rezistencija bakterija postignuta koncentracija antibiotika u ljudskom organizmu nije dovoljna za djelovanje na bakterije<sup>1</sup>. Rezistencija na antibiotike nastaje: malim promjenama u genomu (točkastim mutacijama), velikim promjenama u genomu kao što je umetanje ili gubitak transpozona (malih dijelova DNA koji se mogu premještati na različite pozicije unutar genoma stanice), te unosom vanjske DNA (transformacijama, konjugacijom itd.). Najčešći mehanizmi otpornosti uključuju promjenu mjesta djelovanja antibiotika, smanjenu propusnost stijenke za ulaženje antibiotika, aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice i inaktivaciju antibiotika stvaranjem enzima<sup>15</sup>. Postoje dvije vrste rezistencije koja može biti urođena ili primarna (intrinzična), te sekundarna ili stečena preko mutacija u kromosomskim genima i prijenosom horizontalnim genom<sup>15</sup>.

#### **3.1. Primarna (urođena ili intrinzična) rezistencija**

Primarna rezistencija na određeni antibiotik je sposobnost bakterije da se na temelju svojih strukturalnih ili funkcionalnih karakteristika odupre djelovanju antibiotika<sup>1</sup>. Odnosno kod primarne rezistencije antibiotici nemaju mjesto djelovanja<sup>15</sup>. Primjer primarne otpornosti je lipopeptid daptomicin koji djeluje aktivno protiv Gram-pozitivnih, ali nije učinkovit protiv Gram-negativnih bakterija zbog unutarnje razlike u sastavu citoplazmatske membrane između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Gram-negativne bakterije imaju manji udio anionskih fosfolipida u citoplazmatskoj membrani od Gram-pozitivnih, što smanjuje učinkovitost  $Ca^{2+}$  iona koji posreduje u umetanju daptomicina u citoplazmatsku membranu što je ključno za njegovo antibakterijsko djelovanje<sup>1</sup>.

Primarna rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika (Slika 2.). Antibiotici uskog (užeg) spektra se prepisuju kada je poznato koja bakterija je prisutna, jer su djelotvorni protiv specifičnih vrsta bakterija, kao što je na primjer metronidazol koji djeluje samo na anaerobne bakterije i protozoe<sup>15</sup>. Antibiotici šireg (širokog) spektra djeluju na više vrsta bakterija stoga se prepisuju kada se ne zna koja je točno bakterija uzrokovala bolest, na primjer tetraciklini djeluju na gotovo sve bakterije. Rezistencija također ovisi i o stadiju u kojem se nalazi bakterija. U stadiju mirovanja bakterije su rezistentne na antibiotike koji djeluju na sintezu stanične stijenke. Rezistencija se javlja i kod bakterija koje žive u biofilmu<sup>15</sup>.



Slika 2. Selektivna rezistencija nastala upotrebom određenog antibiotika.<sup>15</sup>

Nedavne studije su dovele do identifikacije mnogih gena koji su odgovorni za primarnu otpornost na antibiotike raznih klasa, uključujući  $\beta$ -laktame, fluorokinolone i aminoglikozide<sup>9</sup>. To je postignuto pomoću visoko-propusnog probiranja genoma visoke gustoće (eng. *high-throughput screens of high-density genome*) stvorene ciljanim ili nasumičnim umetanjem transponirane mutagenaze u bakterije kao što su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas Aeruginosa*<sup>9</sup>. Određivanjem osjetljivosti antibiotika identificirana je moguća nova kombinacija lijekova u kojima jedno sredstvo može spriječiti primarni mehanizam otpora i time povećati spektar aktivnosti drugih antibiotika izvan normalnih ciljnih bakterijskih vrsta<sup>1</sup>. Razumijevanje genetskih osnova primarne rezistencije bakterija, te spektra aktivnosti antibiotika, može unaprijediti razvoj novih kombinacija lijekova s poboljšanom ili proširenom aktivnošću protiv bakterijskih vrsta<sup>1</sup>.

### 3.2. Sekundarna rezistencija

Kada mikroorganizam stekne rezistenciju na neki određeni antibiotik koji je prije na njega djelovao aktivno javlja se tzv. sekundarna rezistencija<sup>17</sup>. Ona nastaje kao procesom prirodnih mutacija bakterijskog genoma, horizontalnim širenjem gena rezistencije ili slučajnim nastankom rezistentnih gena. Takav rezistentan gen dovodi do promjene u bakterijskoj stanici, te ona postane otporna na djelovanje određenog antibiotika, skupinu ili istodobno više različitih skupina antibiotika<sup>15</sup>. Za razliku od primarne rezistencije, osobine karakteristične za sekundarnu rezistenciju nađene su samo u nekim sojevima bakterijskih vrsta. Za otkrivanje sekundarne rezistencije kod bakterijskih vrsta koje nisu primarno otporne koriste se posebne

laboratorijske metode, koje se također koriste i za praćenje vrijednosti sekundarne rezistencije<sup>11</sup>.

Antibiotici vrše selektivni pritisak na bakterijske populacije, bakterije osjetljive na antibiotike ostavljaju mogućnost rezistentnim sojevima da prežive i da se razmnožavaju. Geni za rezistenciju se zatim prenose na stanice kćeri, nakon čega nastane rezistentna populacija koja je sada daljnji izvor rezistentnih gena<sup>18</sup>. Budući da se ne uklanjaju sva svojstva rezistencije, rezistencija na razne vrste antibiotika se može ponovo akumulirati što dovodi do sojeva bakterija s multiplom rezistencijom na lijekove i znatno smanjene mogućnosti liječenja<sup>18</sup>.

### **3.2. Mehanizmi sekundarne rezistencije**

Nekoliko je načina na koje bakterijske stanice mogu djelovati, ili na samu molekulu antibiotika ili na modifikaciju vlastitih staničnih komponenata, kako bi stekli sekundarnu rezistenciju. To su:

#### **a) Inaktivacija antibiotika putem modifikacija ili degradacije**

Bakterije se štite od djelovanja antibiotika tako da unište aktivnu komponentu antibiotika<sup>12</sup>. Klasičan primjer je bakterijski enzim beta-laktamaza koji hidrolitički deaktivira beta-laktamski prsten u penicilinu tako da ga otvara. On postaje ne djelotvoran i ne može se vezati za PBP (protein koji veže penicilin), čime se štiti proces sinteze stanične stijenke<sup>12</sup>.

#### **b) Produkcija enzima koji razgrađuju ili modificiraju antibiotik**

Enzimi razgrađivanjem i modificiranjem inaktiviraju antibiotik, te su često specifični samo za pojedini ili skupinu antibiotika. Neke rezistentne bakterije svoja aktivna mjesta djelovanja antibiotika, prikrivaju pa iako je aktivan antibiotik prisutan do vezanja neće doći.

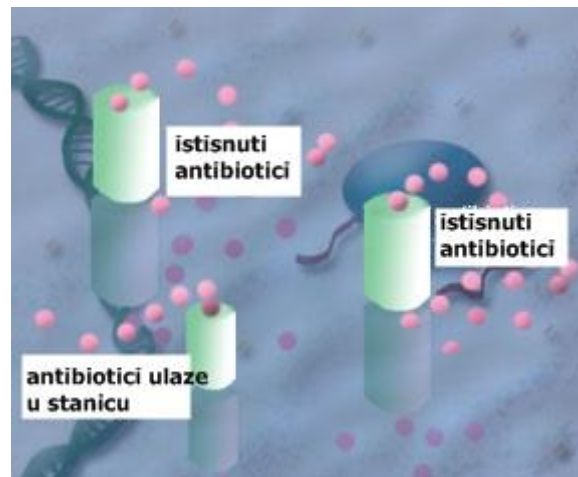
#### **c) Smanjene propusnosti stanične stijenke.**

Antimikrobni spojevi zahtijevaju pristup bakterijskoj stanici kako bi došli do svojeg mjesta djelovanja, preko kojeg mogu ometati normalnu funkciju bakterije<sup>15</sup>. Neke bakterije se štite tako što zabranjuju ulazak antibakterijskih spojeva, koji inače putuju porinama koji su prolazni kanali do vanjske bakterijske membrane. Zabrana ulaska spriječit će antibiotike da dođu do mjesta djelovanja koja su za aminoglikozide i beta laktame ribosomi i penicilin-vezujući proteini (PBP , eng. *penicillin-binding proteins*)<sup>18</sup>.

#### d) Pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpi

Kako bi bili učinkoviti, antibiotici moraju biti prisutni u dovoljno visokoj koncentraciji unutar bakterijske stanice. Neke bakterije posjeduju membranske proteine koje djeluju kao efluks pumpe za određene antibiotike, odnosno izbacuju antibiotik iz stanice jednako brzo kao što on ulazi u stanicu (Slika 3.)<sup>10</sup>. To rezultira niskim intracelularnim koncentracijama koje nisu dovoljne da bi izazvale učinak antibiotika

Selektivne efluks pumpe istiskuju specifične antibiotike kao što su makrolidi, streptogramini i tetraciklini, dok druge (pumpe otporne na više lijekova) izbacuju strukturalno različite antibiotike s različitim načinima djelovanja<sup>18</sup>. Izbacivanje pomoću efluks pumpi zahtijeva utrošak stanične energije i može uzrokovati rezistenciju na različite skupine antibiotika<sup>15</sup>.



Slika 3. Rad efluks pumpi u staničnim stijenkama.<sup>18</sup>

#### 3.2.1. Mehanizmi stjecanja sekundarne rezistencije

##### a) Mutacija bakterijskog genoma

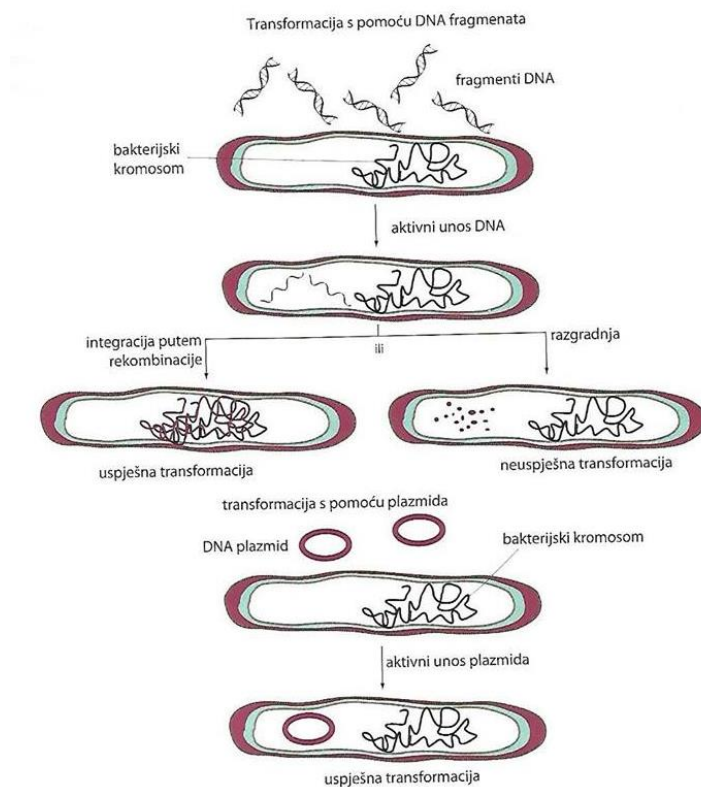
Mutacija je spontana promjena prilikom sinteze nove DNA ili pod utjecajem različitih prirodnih mutagenih čimbenika. Može biti točkasta (promjena jednog nukleotida) i tada ne mora, ali i može doći do fenotipske promjene u stanici<sup>15</sup>. U bakterijskoj stanici, fenotipske se promjene ispoljavaju lako jer je njezin broj kromosoma haploidan. Ako se mutacijom stekne rezistencija, takvi će mutanti postati veći dio populacije ili čak jedina populacija<sup>15</sup>.

Promjena jednog para baza može dovesti do određene promjene u aminokiselini koja je kodirana tim genom, što opet može dovesti do promjene enzima ili stanične strukture, a samim time se mijenja afinitet i cijela aktivnost antibiotika<sup>18</sup>. U prokariotskim genomima mutacije se često pojavljuju kao posljedica promjene jedne od baza i mogu biti uzrokovane egzogenim sredstvom, pogreškom DNA polimeraze te umetanjem ili duplikacijom<sup>18</sup>.

#### b) Horizontalni prijenos gena

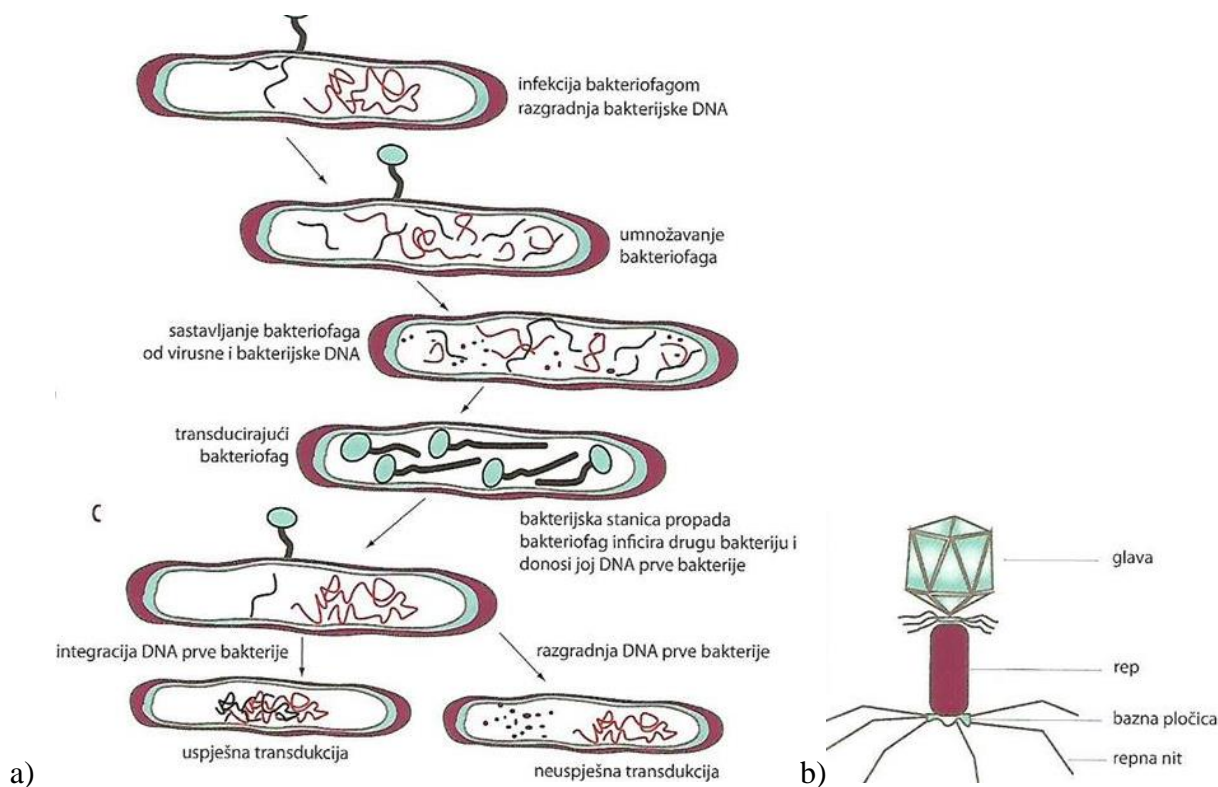
Horizontalni prijenos gena je proces zamjene genetskog materijala između susjednih bakterija. Mnogi se rezistentni geni prenose na plazmidima i transpozonima koji mogu djelovati kao vektori koji prenose ove gene drugim bakterijama iste ili različite vrste ili roda<sup>15</sup>. Horizontalni prijenos, osim stjecanja rezistencije, omogućuje bakterijama i lakšu adaptaciju na promjenjive vanjske uvjete za život bakterija. Horizontalni prijenos gena odvije preko tri glavna mehanizma: transformacija, transdukcija ili konjugacija<sup>15</sup>.

Transformacija je prijenos većih fragmenata DNA iz okoline u stanicu bakterije. Tu se onda DNA rekombinira s homolognim dijelom DNA domaćina<sup>15</sup>. Ako uneseni DNA dio ne odgovara, dolazi do razgradnje endonukleazama (Slika 4.). Uspješnom transformacijom žive si bakterije povećavaju varijabilnost unosom novih gena<sup>18</sup>. Prijenos DNA fragmenata transformacijom može teći u prirodnim uvjetima samo između bakterija iste vrste dok u laboratorijskim uvjetima može doći do uzimanja fragmenata DNA druge bakterijske vrste. Transformacijom se također mogu prenijeti i plazmidi<sup>15</sup>.



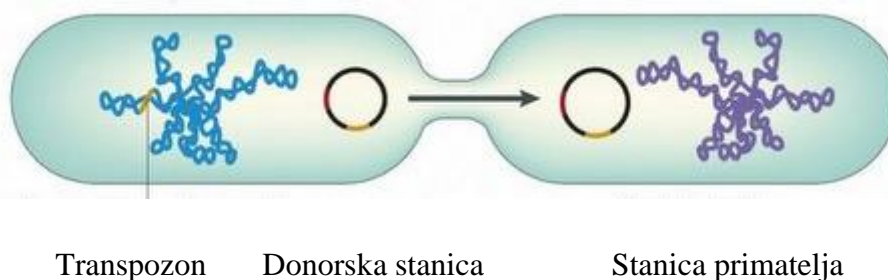
Slika 4. Prijenos većih dijelova gena transformacijom <sup>15</sup>

Transdukcijom dolazi do prijenosa DNA bakterije iz jedne stanice u drugu pri čemu dolazi do rekombinacije gena bakterija (Slika 5a.). Bakteriofag je virus i on inficira bakterije, a njegova nukleinska kiselina ulazi u stanicu dok kapsida ostaje izvan stanice (Slika 5b.). On podređuje stanični metabolizam svojim potrebama pri čemu dolazi do raspada stanice. Novi bakteriofagi odlaze inficirati nove bakterijske stanice. Transdukcija je visoko specifična zbog specifičnosti receptora za fage i odvija se samo unutar određene bakterijske vrste <sup>15</sup>.



Slika 5. a) Proces horizontalnog prijenosa transdukcijom, b) Bakteriofag. <sup>15</sup>

Konjugacija osigurava prijenos plazmida (npr. onog koji nosi gen za rezistenciju) iz bakterije u drugu bakteriju, pri čemu su neki plazmidi specifični pa se prenose samo između određenih vrsta, dok neki mogu imati izrazito malu specifičnost <sup>15</sup>. F-plus bakterije sadrže konjugativne (slobodne) plazmide koji se mogu samostalno prenijeti u drugu bakteriju <sup>21</sup>. Kada se bakterije koje ih ne sadrže tj. F-minus bakterije susretnu s F-plus bakterijama dolazi do pozitivne kemotaksije i ekspresije gena na F-plazmidu (F plazmid nosi gene za stvaranje F-pilusa). Konjugativni plazmid raširi određeno svojstvo prvotne F-plus stanice tako da sa sobom povuče dijelove kromosoma i druge plazmide iako nisu konjugativni (Slika 6.). Također može integrirati u različite dijelove kromosoma pri čemu ponese dio kromosoma u F-minus stanicu i takva se bakterija naziva HFR (eng. *high frequency recombination*) bakterija <sup>15</sup>.



Slika 6. Prijenos gena konjugacijom. <sup>21</sup>



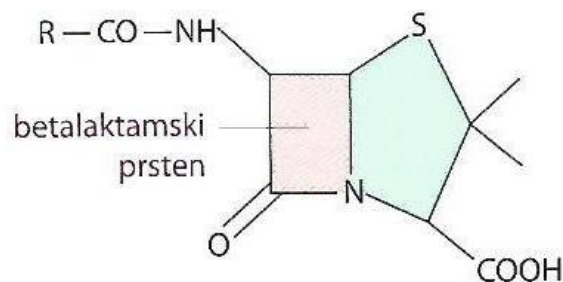
## 4.0. MEHANIZMI STJECANJA OTPORNOSTI BAKTERIJA NA POJEDINE SKUPINE ANTIBIOTIKA

### 4.1. Antibiotici koji djeluju na sintezu stanične stijenke

#### 4.1.1. Betalaktami

Betalaktamski prsten u strukturi ima važni učinak na djelovanje betalaktamskih antibiotika (Slika 7.). Mehanizmi rezistencije na beta laktamske antibiotike su : razaranje antibiotika  $\beta$ -laktamazama, promjenama u porinima, mutacije ciljnih PBP-molekula i efluks. A često bakterije posjeduju više mehanizama<sup>15</sup>.

Najčešći mehanizam rezistencije je razaranje antibiotika  $\beta$ -laktamazama, gdje  $\beta$ -laktamaze imaju veći afinitet za antibiotik nego što antibiotik ima za bakteriju<sup>12</sup>. Geni  $\beta$ -laktamaza smješteni su u kromosomima i izvan kromosoma Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Enzim  $\beta$ -laktamaza katalizira hidrolizu  $\beta$ -laktamskog prstena što uzrokuje njegovo otvaranje i on se takav više ne može vezati za PBP. Ukoliko na  $\beta$ -laktamazu djeluje inhibitor, rezistencija se može spriječiti. Rezistencija se tada odvija vezanjem i inaktiviranjem enzima čime se sprječava razgradnja antibiotika<sup>15</sup>. Zasad nije proizveden niti jedan  $\beta$ -laktamski antibiotik koji je otporan na djelovanje svih  $\beta$ -laktamaza, jer se inhibitori ne mogu vezati za sve  $\beta$ -laktamaze što je ključno za inaktivaciju. Inhibitori  $\beta$ -laktamaza su skupina beta-laktamskih antibiotika, a to su: klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam. Osim razaranja antibiotika  $\beta$ -laktamazama, na rezistenciju djeluju i drugi gore navedeni mehanizmi poput mutacije ciljnih PBP-molekula koje značajno smanjuje afinitet PBP-a za lijek. Izmjene mogu nastati i mutacijom postojećih gena, te javljanjem novih PBP gena<sup>19</sup>.



Slika 7. Struktura betalaktama.<sup>15</sup>

#### 4.1.1.1. Rezistencija na cefalosporine

Cefalosporini su dobiveni iz plijesni *Cephalosporium notatum*. U strukturi sadrže dva prstena,  $\beta$ -laktamski i dihidrotiazinski. Imaju širok spektar djelovanja, no malu toksičnost. Onemogućuju sintezu bakterijske stijenke vezanjem na PBP. Mehanizmi rezistencije bakterija na cefalosporine su produkcija  $\beta$ -laktamaza, gubitak porina vanjske membrane, promjene PBP molekule i efluks<sup>9</sup>. Rezistenciju na cefalosporine prve generacije uzrokuje razaranje antibiotika  $\beta$ -laktamazama širokoga spektra. Prva opisana  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra je SHV-2  $\beta$ -laktamaza pronađena u izolatu *Klebsiella oxytoca*. Dijeli se na 3 porodice: TEM, SHV i CTX-M. CTX-M su  $\beta$  laktamaze proširenog spektra za razliku od TEM i SHV  $\beta$ -laktamaza koje nastaju točkastim mutacijama u blaTEM i blaSHV genu čime se mijenja konfiguracija aktivnog središta tako da sada u njega mogu ući oksimino-cefalosporini i ostale molekule s velikim postraničnim lancima. Geni koji kodiraju  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra nalaze se najčešće na konjugativnim plazmidima<sup>15</sup>.

#### 4.1.1.2. Rezistencija na karbapeneme

Karbapenemi su semisintetski derivati tienamicina koji se vežu na PBP 1 i PBP 2 molekule Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija uzrokujući razgradnju stanica. Proizvodi ih *Streptomyces spp.* Otporni su na hidrolizu  $\beta$ -laktazama proširena spektra, ali su osjetljivi na karbapenemaze. Rezistenciju na karbapeneme uzrokuje produkcija karbapenemaza. To su bakterijski enzimi koji svojim djelovanjem razgrađuju karbapeneme. Stečenu rezistenciju uzrokuju karbapenemaze A,B i D grupe. Karbapenemaze grupe A inhibirane su klavulanskom kiselinom, one hidroliziraju peniciline, aztreonam, karbapeneme, te drugu i prvu generaciju cefalosporina. Prva izolirana karbapenemaza iz grupe A je NMC-A iz *E.cloacae*<sup>9</sup>. U grupi B karbapenemaza spadaju metalo- $\beta$ -laktamaze koje su osjetljive na inhibiciju metalnim-kelatorima. Treba im cink kao kofaktor. Uzrokuju visoku rezistenciju na karapeneme, cefalosporine i peniciline. Karbapenem-hidrolizirajuće karbapenemaze uzrokuju rezistenciju na peniciline,cefalosporine uskog i širokog spektra,monbaktame i karbapeneme. Najčešće se javljaju u *Acinetobacter baumannii*<sup>15</sup>.

Uslijed hiperprodukcije  $\beta$ -laktazama proširenog spektra ili plazmidnih ampC  $\beta$ -laktazama u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane enterobakterije mogu steći rezistenciju na karbapeneme<sup>15</sup>.

U Hrvatskoj je zabilježena rezistencija na karbapeneme u *Klebsiella pneumoniae* zbog produkcije KPC-2  $\beta$ -laktamaze. Karbapenemaze se detektiraju u laboratoriju Hodge testom i metodom dvostruko kombiniranih diskova. Postoje 3 metode dvostruko kombiniranih diskova. U prvoj se koristi fenil-boronična kiselina (PBA) i njome se može detektirati KPC  $\beta$ -laktamaza, te druga metoda s EDTA koristi se za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza<sup>8</sup>. Treća metoda je kombinacija EDTA i PBA za detekciju kombinirane produkcije KPC-a i metalo- $\beta$ -laktamaza<sup>8</sup>.

#### 4.1.1.3. Inhibitori $\beta$ -laktamaza – Klavulanska kiselina

Klavulanska kiselina se dobiva iz kulture *Streptomyces clavuligerus*. Inhibira  $\beta$ -laktamaze mnogih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Inhibira  $\beta$ -laktamaze formirajući s njima ireverzibilni acilni kompleks. S penicilinima i cefalosporinima djeluje sinergistički protiv stafilokoka koji proizvode  $\beta$ -laktamaze.

Rezistencija može nastati dvama glavnim mehanizmima. Prvi je inaktivacija  $\beta$ -laktamazama koje ne podilaze inaktivaciji klavulanskom kiselinom. A drugi je promjena PBP-a što uzrokuje manji afinitet antibiotika. Kod Gram-negativnih bakterija, bakterijsku rezistenciju može uzrokovati, ili joj doprinijeti, nepropusnost stijenke bakterija za lijek ili mehanizam izbacivanja lijeka efluks pumpom<sup>15</sup>.

#### 4.1.2. Glikopeptidi

Glikopeptidi čine skupinu velikih molekula koje mogu djelovati kao antibiotici, no zbog veličine ne mogu ulaziti kroz staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija. Inhibiraju sintezu peptidoglikana vezanjem na staničnu stijenku bakterija<sup>15</sup>. Vežu se na D-alanin-D-alanin (završetak pentapeptida) te sprječavaju njegovu ugradnju u peptidoglikanski lanac. Primjenjuju se kod teških infekcija uzrokovanih stafilokokima rezistentnim na meticilin i kod infekcija uzrokovanih *Clostridium difficile*. Vrlo su toksični, njihova primjena može dovesti do brojnih nuspojava kao što su oštećenje bubrega, gluhoća, kožni osipi, itd<sup>15</sup>.

##### 4.1.2.1. Rezistencija na glikopeptide

Rezistencija kod enterokoka zbiva se mehanizmom zamjene D-alanin-D-alanina s D-alanin-D-laktatom kodiranim genom nazvanim *vanA* gen. Na zamijenjeni D-alanin-D-laktat, glikopeptid se ne može vezati što dovodi do rezistencije pri čemu se stanična stijenka nastavlja neometano izgrađivati<sup>15</sup>.

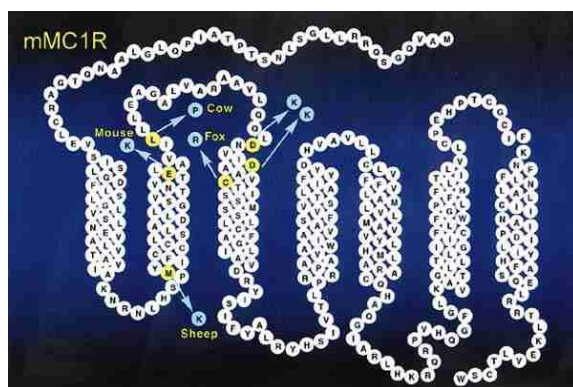
## 4.2. Antibiotici koji djeluju na citoplazmatskoj membrani

### 4.2.1. Polimiksini

Polimiksini su skupina polipeptidnih antibiotika koji djeluju baktericidno na mnoge Gram-negativne bakterije. Naročito baktericidno djeluju na *Pseudomonas aeruginosa*. Njihovo djelovanje se očituje uništavanjem funkcije aktivnog transportera vezanjem na citoplazmatsku membranu. To dovodi do gubitka svojstva osmotske barijere, pa sadržaj stanice izlazi iz citoplazme i bakterija propada<sup>15</sup>.

#### 4.2.1.1. Rezistencija na polimiksine

Nedavno otkriven *MCR-1* gen dovodi do rezistencije bakterija na gotovo sve poznate antibiotike (Slika 8.). Sve su do sada poznate otpornosti posljedica mutacije gena. Kako se gen *MCR-1* nalazi u plazmidu, dolazi do brzog širenja otpornosti bakterija na polimiksine, jer su plazmidi nezavisne i samoreplicirajuće čestice<sup>22</sup>.



Slika 8. Struktura MCR-1.<sup>22</sup>

## 4.3. Antibiotici koji sprječavaju sintezu proteina

### 4.3.1. Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su skupina baktericidnih antibiotika, sastoje se od aminociklitolskog prstena za koji su vezani amino-šećeri. Inhibiraju sintezu bjelančevina ireverzibilnim vezanjem na 30 S-podjedinicu ribosoma. Takav vezani ribosom je spriječen obavljati translaciju mRNA tijekom sinteze proteina. Ako ne dođe do sinteze proteina dolazi do smrti bakterijske stanice<sup>23</sup>.

#### 4.3.1.1. Rezistencija na aminoglikozide

Do rezistencije može doći enzimskom modifikacijom kao što su fosforilacija, adenilacija i acetilacija. Enzimi zaslužni za inaktivaciju antibiotika kodirani su genima na plazmidima i kromosomu, a pronađeni su i u Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Takav modificirani antibiotik ne može lako proći kroz citoplazmatsku membranu. Također rezistenciju rjeđe uzrokuje promjena na ribosomima što uzrokuje smanjeni afinitet za antibiotik<sup>15</sup>.

#### 4.3.2. Tetraciklini

Tetraciklini su skupina antibiotika najširega spektra, djeluju na Gram-pozitivne bakterije i Gram-negativne bakterije. Koriste se samo za strogo ciljane indikacije zbog visoke toksičnosti<sup>3</sup>. U mehanizmu djelovanja vežu se za 16S dio 30S podjedinice ribosoma, čime zbog spriječenosti translacije mRNA ne dolazi do sinteze proteina<sup>24</sup>.

##### 4.3.2.1. Rezistencija na tetracikline

Bakterije mogu steći rezistenciju na tetracikline promjenom mjesta vezanja na ribosomu, efluksom, te promjenom propusnosti pora na staničnoj stijenci Gram-negativnih bakterija. Efluksom dolazi do stvaranja membranskog proteina, a on izbacuje tetracikline iz stanice. Rezistencija efluksom je najčešći mehanizam na Gram-negativne bakterije. Najčešći mehanizmi kod Gram-pozitivnih bakterija je aktivni efluks i promjena veznog mjesta na ribosomu čime slabi afinitet vezanja antibiotika za ciljnu strukturu<sup>9</sup>. U inaktivaciji enzimom dolazi do vezanja acetilne skupine pomoću enzima i takav tetraciklin ne može se vezati. Geni odgovorni za takve tipove rezistencije nalaze se na plazmidu i u kromosomima<sup>19</sup>.

#### 4.3.3. Glicilciklini

Glicilciklini su sintetski antibiotici, dobiveni iz tetraciklina. Tigeciklin je do sada jedini glicinski antibiotik predstavnik u kliničkoj primjeni<sup>20</sup>. Djeluje jednakim mehanizmom kao i tetraciklin, ali ima veći afinitet za vezanje na ribosom pa je djelotvorniji prema bakterijama rezistentnim na tetracikline<sup>13</sup>. Tako djeluje na rezistentne stafilokoke, enterobakterije i acinobakterije. No, ovi spojevi ne djeluju na bakterije sa kromosomalnom efluks pumpom kao što su rodovi *Pseudomonas* i *Proteaeae*<sup>15</sup>.

#### 4.3.4. Kloramfenikol

Kloramfenikol je bakteriostatski agens koji se može dobiti iz bakterija roda streptomiceta, a danas se najviše dobiva sintetički<sup>30</sup>. Veže se na 50S podjedinicu ribosoma što dovodi do inhibicije sinteze proteina, jer je spriječeno produljenje polipeptidnog lanca<sup>30</sup>. Koristi se za liječenje teških infekcija. Uzrokuje mnoge nuspojave kao što je prolazna anemija, aplastična anemija, gastrointestinalni poremećaji<sup>15</sup>.

##### 4.3.4.1. Rezistencija na kloramfenikol

Tri su mehanizma rezistencije na kloramfenikol: smanjena propusnost membrane, mutacija 50S podjedinice ribosoma i proizvodnja acetiltransferaze<sup>15</sup>. Visoku otpornost najčešće uzrokuje *cat* gen koji kodira acetiltransferazu koja može inaktivirati kloramfenikol kovalentnim povezivanjem jedne ili dvije acetilne skupine acetil-S-koenzima na hidroksilne skupine molekule kloramfenikola. Sojevi *Enterococcus faecium* i *Pseudomonas aeruginosa* stekli su otpornost na kloramfenikol<sup>15</sup>.

#### 4.3.5. Makrolidi

Makrolidi su velike molekule koje inhibiraju sintezu proteina bakterija, interferirajući s reakcijom translokacije<sup>27</sup>. Vežu se na 23S rRNA. Djeluju većinom na Gram-pozitivne, ali i na neke Gram-negativne bakterije. Mogu djelovati baktericidno i bakteriostatsko. Iz makrolida izvedena je nova skupina lijekova ketolida koji mogu uzrokovati gastrointestinalne poremećaje<sup>15</sup>.

##### 4.3.5.1. Rezistencija na makrolide

Rezistencija najčešće nastaje metilacijom receptora na 23S ribosomskoj RNA. Često se nazivanim i rezistencijom tipa  $MLS_B$ <sup>27</sup>. Sojevi *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* su rezistentni na makrolide. Kod stafilokoka efuksna je pumpa kodirana sa *msrA*-genima, te ona uvjetuje rezistenciju na makrolide<sup>4</sup>. Rezistencija može nastati i M-tipom rezistencije gdje je aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice kodirano *mef*-genima, a fenotipski se ispoljava rezistencijom samo na 14- i 15- članske makrolide<sup>7</sup>.

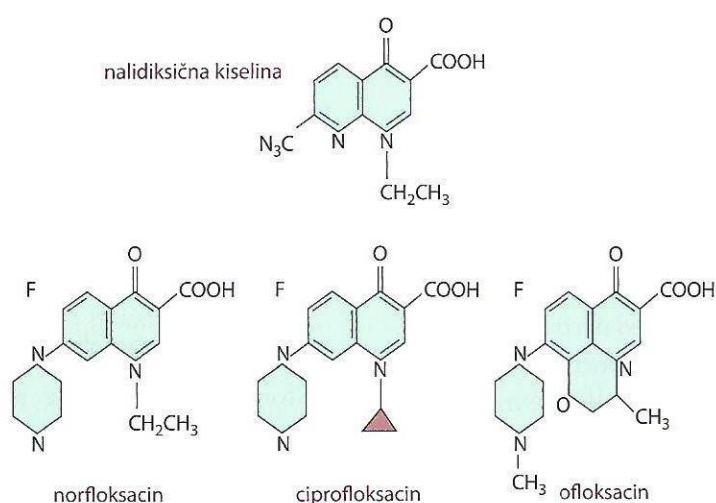
#### 4.3.6. Linkozamidi

Linkozamidi su antibiotici koji se vežu na 50S podjedinicu ribosoma, te tako inhibira sintezu proteina. Slični su makrolidima po djelovanju i po  $MLS_B$  tipu rezistencije. Najvažniji predstavnik je klindamicin<sup>15</sup>.

## 4.4. Antibiotici koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina

### 4.4.1. Kinoloni

Sintetski antibiotici, inhibiraju sintezu bakterijske DNA blokiranjem enzima DNA-giraze<sup>9</sup>. Djeluju brzo baktericidno. Inhibicijom bakterijske DNA giraze (odgovorne za stvaranje uzvojnice DNA) uzrokuju smrt bakterijske stanice. Niske su toksičnosti jer se DNA giraze bakterije i čovjeka razlikuju. Većina kinolina u upotrebi su fluorokinoloni koji imaju atom fluora vezan za prsten obično na poziciji C-6 ili C-7 (Slika 9.)<sup>15</sup>.



Slika 9. Različite strukture kinolona.<sup>15</sup>

#### 4.4.1.1. Mehanizam rezistencije na kinoloni

Rezistencija na kinolone može nastati na tri načina. Promjenom mjesta djelovanja odnosno DNA giraze tako da antibiotik ne reagira s aktivnošću enzima. Drugi način je smanjenjem propusnosti stanice, te također pojačanim radom efluksnih proteina<sup>15</sup>.

Kod bakterija soja *Staphylococcus* i *Pseudomonas spp.* uočena je rezistencija na nove fluorirane kinolone. Kod nekih bakterija razvija se mutacija kojom mogu aktivno izbacivati kinolone iz stanice te se tako štite od djelovanja<sup>19</sup>.

### 4.4.2. Rifamicini

Rifamicini su antibiotici inhibitornog djelovanja na RNA polimeraze čime sprječavaju sintezu stanične RNA. Djeluju protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Najpoznatiji predstavnici su rifampicini koji se koriste u liječenju tuberkuloze i infekcija

uzrokovanih stafilokokama. Rifabutin je drugi derivat rifamicina koji se koriste za liječenje tuberkuloze<sup>15</sup>.

#### 4.4.2.1. Rezistencija na rifamicine

Rezistencija na rifamicine se može javiti jako brzo jer se visoko rezistentni mutanti pojavljuju u  $10^{-6}$  do  $10^{-5}$  bakterija u samo jednoj populaciji<sup>15</sup>. Zbog te brze pojave koriste se samo u kombinaciji s drugim antibioticima. Nastankom mutacije u RNA polimerazi sprječava se vezanje enzima na antibiotik. Zbog brzog nastanka rezistencije kod stafilokoka se koristi u kombinaciji s drugim antibioticima<sup>19</sup>.

#### 4.4.3. Metronidazol

Metronidazol je baktericidan antibiotik djelotvoran protiv anaerobnih i mikroaerofilnih bakterija. Učinkovit je kod meningitisa, apcesa pluća i mozga, endokarditisa i raznovrsnih infekcija. Djeluje kao i antiprotozoik protiv *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* i ameba. Oštećuje bakterijsku DNA, a jako rijetko uzrokuje rezistenciju. Rezistencija u rijetkim slučajevima može nastati promjenom propusnosti ili promjenom bakterijske reduktaze<sup>15</sup>.

#### 4.4.4. Sulfonamidi i trimetoprim

Sulfonamidi i trimetoprim su sintetski bakteriostatski antimikrobici. Kompetitivno inhibiraju konverziju paraaminobenzoične kiseline u dihidropteroat<sup>25</sup>. Dihidropteroat trebaju bakterije za sintezu folne kiseline<sup>25</sup>. Folna kiselina, koju mnoge bakterije same sintetiziraju, je prekursor purina<sup>9</sup>. Trimetoprim i sulfonamidi koriste se zajedno zbog sinergističkog učinka. Sulfonamidi ometaju pretvorbu paraaminobenzoične kiseline u fihidrofolnu kiselinu, dok trimetoprim sprječava pretvorbu dihidrofilne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu. Djeluju i na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije<sup>15</sup>.

##### 4.4.4.1. Rezistencija na sulfonamide i trimetoprim

Upotrebom alternativnog metaboličkog puta za sintezu nukleinskih kiselina i smanjenom propusnosti bakterijske stanične stjenke za antimikrobne lijekove, nastaje rezistencija na sulfonamide i trimetoprim kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija<sup>15</sup>. Nastankom rezistencije dolazi do proizvodnje dihidrofolne reduktaze kod bakterija neosjetljivih na trimetoprim<sup>19</sup>. Neke bakterije mogu imati primarnu rezistenciju. Kod bakterija roda *Pseudomonas* javlja se primarna rezistencija zbog slabije propusnosti i smanjenog afiniteta reduktaze dihidrofolata<sup>22</sup>.



#### **4.5. Antituberkulotici**

Antituberkulotici su skupina antibiotika namijenjena za liječenje tuberkuloze i infekcija uzrokovanih sličnim bakterijama. Dijele su antituberkulotike prvog i drugog reda, u prvoj skupini nalaze se antibiotici protiv *Mycobacterium tuberculosis* (izoniazid, rifampicin, streptomycin), dok se u drugoj skupini nalaze antibiotici koji se primjenjuju kod bakterija rezistentnih na antibiotike prvog reda (rifabutin, kinolini, makrolid, itd.)<sup>15</sup>. *Mycobacterium tuberculosis* je sporo rastuća bakterija, kod koje divlja populacija ima na svakih 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> klica po jednu klicu rezistentnu na antituberkulotik<sup>19</sup>. Zbog različitih vrsta antibiotika koji djeluju protiv tuberkuloze postoje razne vrste mehanizama rezistencije. Zato se većina njih koristi u kombinacijama uz sinergistički efekt. Neredovitim uzimanjem lijekova dolazi do stečene rezistencije gdje bolesnik postaje izvor daljnjeg širenja bolesti. U nerazvijenim zemljama još je uvijek veliki problem vrlo visoko razvijena rezistencija na antituberkulotike<sup>26</sup>.

## 5.0. MULTIPLA REZISTENCIJA

Liječenje infekcija otežano je širom svijeta zbog pojave bakterija otpornih na više antibiotika. Najveću opasnost predstavljaju MDR bakterije. MDR bakterije su otporne na barem jedan antibiotik u 3 ili više antibiotskih grupa. Različitim stupnjevanjem dijele se na intenzivno otporne na lijekove (XDR) i na panrezistentne (PDR)<sup>12</sup>. Iako se otpornost bakterijama više antibiotika klasično pripisuje djelovanju kromosomskih mutacija, ona je najčešće povezana sa stjecanjem ekstra kromosomskih elemenata od drugih bakterija u okolini. Kao što su različite vrste mobilnih DNA segmenata (plazmidi, transpozoni i integroni). Međutim, intrinzični mehanizmi određeni su efluks pumpama koje istjeruju više vrsta antibiotika, te su sada prepoznate kao glavni doprinositelji otpornosti bakterija na više lijekova<sup>12</sup>. U novijim istraživanjima pokazano je da okolina može djelovati kao izvor za nove i stare mehanizme rezistencije<sup>4</sup>. U istraživanom tlu staništa *Streptomycina* pronađeno je da je svaki tamo prisutan organizam otporan na više lijekova (najmanje 7 različitih antibiotika)<sup>16</sup>. Time je utvrđeno da liječenje zaraznih bolesti i infekcija ima znatno dugotrajniji učinak od toga kako se ranije smatralo (samo za vrijeme primjene antibiotika). Mnoge antimikrobne molekule postoje tisućljećima stabilno unutar naše okoline gdje potiču rast otpornih sojeva. Otpornost na pojedinačne antibiotike postala je istaknutija kod organizama za koje su među prvima komercijalno proizvedeni antibiotici<sup>12</sup>.

Tijekom godina, upotreba različitih lijekova dovela je do dodatnih vrsta mehanizama otpora što je rezultiralo pojavom otpornosti na više lijekova (MDR). U mehanizmima otpora sudjeluju PBP, enzimski mehanizmi modifikacije lijeka, pojačani efluks pumpom i promijenjena permeabilnost membrane. Otpornost na antibiotike može nastati prirodnim ili stečenim putem i te se razmjene događaju kroz procese transdukcije (putem bakteriofaga), konjugacije (preko plazmida i konjugativnih prijenosnika), te transformacija (putem ugrađivanja u kromosom kromosomske DNA, plazmida i drugih DNA iz umirućih organizama). Ti se prijenosi događaju i između različitih rodova. Plazmidi sadrže rezistentne gene koji se repliciraju neovisno o kromosomu domaćina. Kod višestrukih plazmida njihovi su geni dodaju ukupnoj genetici organizma u kojem se nalaze. Transpozoni su pokretni genetički elementi koji mogu postojati na plazmidima ili se integriraju u druge transpozone kromosoma domaćina<sup>28</sup>. Konjugativni transpozoni sadrže kvalitetne plazmide i olakšavaju prijenos endogenih plazmida iz jednog u drugi organizam. Integroni sadrže zbirke gena i imaju sposobnost integrirati se stabilno u područje drugih DNA. Na tim područjima isporučuju nove gene, jednom razmjenom, posebno gena odgovornih za rezistenciju<sup>28</sup>.

## 5.1. Multiplo rezistentni organizmi

Jedni od najproblematičnijih multiplo rezistentnih organizama su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, enterokoki rezistentni na vankomicin (VRE), *Staphylococcus Aureus* otporan na meticilin (MRSA) i *Mycobacterium tuberculosis*. Organizmi kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* uspijevaju se oduprijeti gotovo svakom lijeku<sup>5</sup>. Kod bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* pronađena su kromosomska mjesta koja određuju globalne regulacijske proteine koji kontroliraju multiplu rezistenciju<sup>5</sup>. Regulatorni proteini djeluju kao aktivatori ili represori transkripcije i sadržavaju jednostruku DNA vezujuću domenu ili 2 razdvojene regije odgovorne za DNA vezanje i interakciju s malim molekulskim podlogama<sup>29</sup>. Kod bakterije *Escherichia coli* sudjeluje protein *MarA* kao regulator ekspresije velikog dijela kromosomskih gena uključujući i one specijalizirane za efluks pumpu multiple rezistencije (MDR)<sup>29</sup>.

## 6.0. Detekcija antibiotske otpornosti

Zbog velike i česte rezistencije na antibiotike, prije liječenja određenog patogena mora se provesti ispitivanje na antimikrobnu osjetljivost<sup>18</sup>. Može se odrediti rezistencija ili pak osjetljivost izolata na antibiotike čime se dobiveni rezultati mogu iskoristiti za dobivanje smjernica za najbolju opciju liječenja. Metode se mogu provesti i praćenjem širenja rezistentnih bakterija. Tim se metodama treba uspostaviti tražene vrijednosti za sve kombinacije bakterija i antibiotika koje govore na koju su količinu antibiotika bakterije rezistentne ili osjetljive. Standardni uvjeti i smjernice za takva istraživanja dobivena su opsežnim laboratorijskim istraživanjima i obično su propisane organizacijama diljem svijeta kao što su to CLSI (Institut za kliničke i laboratorijske standarde), EUCAST (Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), SRGA (Swedish Reference Group for Antibiotics) itd<sup>18</sup>.

### 6.1. Laboratorijska istraživanja

Da bi se provelo laboratorijsko istraživanje rezistencije na antibiotike potrebno je nekoliko uzeti u obzir nekoliko stvari kao što su: čistoća izolata, klinička važnost izolata, dostupnost resursa i metodologije, ekonomičnost i valjano tumačenje rezultata. Pošto su svi ovi postupci provedeni *in vitro* oni su samo aproksimacija *in vivo* uvjeta koji se mogu znatno razlikovati ovisno o prirodi primijenjenog lijeka i prirodi domaćina. Kontrola kvalitete, vrlo bitne za laboratorijsko istraživanje uključuje: uvjete kulture (kao što su pH, uzgojni medij, koncentracija kationa), uvjeti inkubacije (temperatura, trajanje), koncentracija antibiotika<sup>18</sup>. Laboratorijska istraživanja ovisno o vrsti mogu potrajati i do nekoliko dana zato liječnici mogu koristiti prethodno utvrđene antibiogramme koji predstavljaju tablicu osjetljivosti najčešćih izolata u bolnici<sup>18</sup>.

### 6.2. Metode testiranja

Danas postoji nekoliko metoda za ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike gdje sve imaju isti cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik. Takvi dobiveni podaci mogu se primijeniti za sprječavanje širenja otpora na antibiotike i na taj način olakšati liječenje raznih infekcija<sup>18</sup>. Neki primjeri metoda testiranja osjetljivosti antibiotika su:

- a) Metoda razrjeđivanja
- b) Disk-difuzijska metoda

- c) E-testa
- d) Automatizirana metoda
- e) Testovi specifični za mehanizam rezistencije
- f) Genotipske metode kao što su PCR i DNA hibridizacijske metode

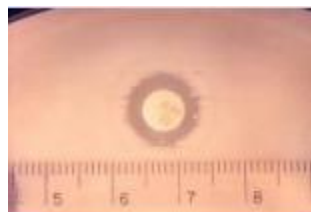
#### 6.2.1. Metoda razrjeđivanja

Metoda razrjeđivanja bujona uključuje podvrgavanje izolata bakterije nizu različitih koncentracija antibiotika u bujonskoj sredini<sup>18</sup>. Dvije su vrste bujon metode razrjeđivanja i kod obje najniža koncentracija kod koje je izolat potpuno inhibiran označava se kao minimalna inhibitorska koncentracija ili MIC.

Metoda razrjeđivanja agara je slična razrjeđivanju bujona. Postupak razrjeđivanja agara slijedi princip uspostavljanja najniže koncentracije razrijeđenog antibiotika, odnosno koncentracije gdje je rast bakterije još uvijek inhibiran<sup>18</sup>.

#### 6.2.2. Disk-difuzijska metoda

Mueller-Hinton agar obično se koristi kao medij za rast i on se prvo uniformno zasijava kroz ploče sa izolatom razrijeđenim u standardnu koncentraciju. Prethodno impregnirani standardnom koncentracijom određenog antibiotika, te komercijalno pripremljeni diskovi su raspršeni i lagano utisnuti na površinu agara. Test započinje odmah s raspršivanjem od diska, stvaranjem istovremeno gradijent antibiotskih koncentracija tako da se najviša koncentracija nalazi najbliže disku. Nakon nekog vremena promatra se rast bakterija na pojedinačnim diskovima. Ako je izolat osjetljiv na antibiotik oko određenog diska uočava se zona bez rasta koja se naziva zona inhibicije jer označava minimalnu koncentraciju antibiotika dovoljnu da spriječi rast bakterija<sup>18</sup>. Na primjer *Escherichia coli* ima zonu inhibicije 10.1mm oko ampicilina (Slika 10.).



Slika 10. Disk metoda na *Escherichia coli* .<sup>18</sup>

### 6.2.3. E-test

Test koji koristi plastičnu test traku s postepeno padajućom vrijednosti koncentracije određenog antibiotika. Na traci se nalazi numerička vrijednost koncentracije antibiotika., te se tako ovim testom osigurava kvantitativne rezultate antibiotske rezistencije kliničkih izolata.

### 6.2.4. Automatizirane metode

Osiguravaju pripremljene i oblikovane ploče za mikrodiluciju, instrumentaciju i automatsko očitavanje ploča. Većina takvih automatiziranih sustava za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike osigurava i automatsku inokulaciju, čitanje te tumačenje. Velika im je prednost što su brzi, ali velika je mana što su skupi<sup>18</sup>.

### 6.2.5. Testovi specifični za mehanizam rezistencije

Test se obavlja na temelju otkrivenog prisutnog mehanizma rezistencije. Kao što se detekcija beta laktamaza može provesti upotrebom kromogenog testa cefalosporinaze<sup>18</sup>.

### 6.2.6. Genotipske metode

Često rezistencija ovisi i rezistentnim genima stoga postoji metoda testiranja koja koristi takve specifične gene<sup>18</sup>.

Neke od najčešćih molekularnih tehnika za otkrivanje otpornosti na antibiotike:

- a) PCR je jedna od najčešće upotrebljivanih molekularnih tehnika za detekciju određene DNA sekvence. U tu je tehniku uključeno nekoliko ciklusa denaturacije uzorka DNA, žarenje specifičnih početnica na ciljne sekvence, i produživanje tih sekvenci olakšano termostabilnim polimerazama dovodeći do replikacije i duplikacije DNA sekvenci<sup>18</sup>.
- b) DNA hibridizacija temelji se na specifičnim parovima purina i pirimidina u DNA. Stoga se sonda označena s poznatim slijedom baza može spariti sa denaturanom DNA iz uzorka. Pojavom ove hibridizacije sonda se označava sa signalnim radioaktivnim izotopom ili enzimom, a ukoliko nema ciljne sekvence ili izolat ne sadrži specifični gen ne dolazi do otkrivanja signala<sup>18</sup>.

## 7.0. ZAKLJUČAK

Antibiotici su, od otkrića u 20.st. do danas, postali jedni od najznačajnijih lijekova u povijesti medicine. Već prvi otkriveni antibiotik, penicilin, ostvario je značajan uspjeh njegovom upotrebom u liječenju za vrijeme II. svjetskog rata. Prema predviđanjima, profesora i bakteriologa Aleksandra Fleminga, za nastanak rezistencije na penicilin, rezistencija se razvila i prema kasnije otkrivenim antibioticima. Godine nepravilnog i prekomjernog konzumiranja antibiotika dovele su do rezistencije za gotovo sve do sada primijenjene antibiotike. Otpornost bakterija na tretmane antibioticima znatno ugrožava ljudsko zdravlje otežavanjem liječenja ne samo bolesti uzrokovanih bakterijama već i drugih bolesti. Kod rezistencije bakterija liječenje infekcija postane otežano i produženo, a samim tima može uzrokovati teške posljedice. Zbog te činjenice prekomjerna upotreba antibiotika uzrokovala je kontraefekt i dovela do povećanja oboljenja i smrtnosti.

Do rezistencije kod bakterija može doći malim promjenama u genomu tj. točkastim mutacijama, velikim promjenama u genomu kao što je umetanje ili gubitak transpozona, te unosom vanjske DNA. Rezistencija može biti urođena ili primarna gdje se bakterija odupire djelovanju antibiotika na temelju svojih strukturalnih karakteristika. Također rezistencija može biti i sekundarna ili stečena kada bakterija naknadno stekne rezistenciju na antibiotik na koji je ranije bila osjetljiva. Antibiotici imaju različita mjesta djelovanja u stanici bakterije. Od antibiotika koji djeluju na sintezu stanične stijenke najznačajniji su betalaktamski antibiotici koji u strukturi sadrže betalaktamski prsten. Od djelovanja betalaktamskih antibiotika, bakterije se najčešće brane  $\beta$ -laktamazama, koje razaraju strukturu betalaktamskog prstena. Takav prsten da više se ne može vezati za PBP (proteine koji vežu penicilin). Rezistenciju na polimiksine, predstavnike antibiotika koji djeluju na citoplazmatsku membranu, bakterije najbrže dostižu nedavno otkrivenim MCR-1 genom. Protiv antibiotika koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina bakterije se brane promjenom mjesta djelovanja antibiotika, smanjenjem propusnošću stanice, te pojačanim radom efluksnih proteina. Na antibiotike koji sprječavaju sintezu proteina postoje mnogi rezistentni mehanizmi kao što su fosforilacija, adenilacija, efluks, promjena mjesta vezanja itd... Posebni problem u liječenju infekcija stvaraju bakterije otporne na više antibiotika takozvane MDR (multiple drug resistance) bakterije. One mogu biti intenzivno otporne na lijekove ili panrezitentne. MDR bakterije najčešće nastaju stjecanjem ekstrakromoskih elemenata od drugih bakterija u okolini.

Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bolesti uzrokovane bakterijom, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. S tim dobivenim rezultatima i sa smjericama propisanim od raznih organizacija (npr. EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), određuje se najbolja opcija liječenja. Pošto nije jedini problem rezistencija bakterija na antibiotike već i nedovoljan razvitak novih antibiotika kombiniranje informacija s do sada provedenih istraživanja moglo bi dovesti do pronalaska novih vrsta antibiotika.



## 8.0. LITERATURA

1. A. J. Baylay, M. A. Blair Jessica , Mark A. Webber, , David O. Ogbolu, Laura J. V. Piddock, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13** (2015.), 42-51.
2. A. Tambić Andrašević, Prevelika uporaba antibiotika – bakterije uzvraćaju udarac, *Acta. Med. Croat.*, **58** (2004), 245–250.
3. A. Tambić Andrašević, Otpornost bakterija na antibiotike - vodeći problem medicine u 21. Stoljeću , *Medicina*, **43** (2007), 7-14.
4. A. Tambić Andrašević, Twenty Years of Azithromycin – Sensitivity of Major Pathogens, *Medicus*, **17** (2008), 15-20.
5. A.S Levin, A.S., A.A. Barone., A.A., J. Penco, J., M.V. Santos, I.S. M.V., Marinho, E.A. I.S., Arruda, E.I. E.A., Manrique, E.I., S.F. and Costa, S.F., Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. ", *Clin. Infect. Dis.*, **28** (1999), 1008-1011.
6. D.W. Smith, Decreased antimicrobial resistance after changes in antibiotic use, *Pharmacother.*, **19** (1999), 129–131.
7. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin, Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000
8. Franolić-Kukina i suradnici, Evolucija rezistencije na beta-laktamske antibiotike u *Enterobacter Spp.* u Hrvatskoj, Liječ. Vjesn., **138** (2016), 240-249.
9. K. L. Blake, & A. J., O'Neill, Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents, . *J. Antimicrob. Chemother.*, **68** (2013) , 12–16.
10. M. Gužvinec, I. Butić, M. Jelić, S. Bukovski, S. Lucić, A. Tambić Anrašević, Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Infektološki glasnik*, **32** (2012), 71–80.
11. M. Payerl-Pal, Potrošnja antibiotika u hrvatskim bolnicama, *Infektološki glasnik*, **29** (2009), 157-164.
12. M.N. Alekshun , S.tuart B. Levy, Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, **128** (2007), 1037-1050.
13. N.I. Paphitou, Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **42** (2013), 25–8.

14. S. Kalenić , The resistance of bacteria to antibiotics , *Medicus*, **9** (2000),149-153.
15. S. Kalenić, Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
16. V.M. D'Costa, V.M., K.M. McGrann, D.W. K.M., Hughes, D.W., and G.D. Wright, G.D., Sampling the antibiotic resistome, *Science*, **311** (2006), 374–377.
17. Ž. Znidarčić, Medicinska etika 2, CENTAR ZA BIOETIKU ZAGREB, 2006.
18. <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance/acquired-resistance/acquired-resistance> (23.6.2017.)
19. <http://farmaceuti.com/tekstovi/farmakologija-2/mehanizmi-rezistencije-antibiotika/> (25.6.2017)
20. <http://jsonpedia.org/annotate/resource/html/sh:Glicilciklin> (16.7.2017)
21. <http://sgugenetics.pbworks.com/w/page/52663559/Molecular%20evolution%20In%20Nature> (26.7.2017.)
22. <http://www.hrvatski-fokus.hr/index.php/znanost/15311-zabrinjavaju-otkrice-kineskih-znanstvenika> (21.6.2017.)
23. <http://www.jelena-suran.com/predavanja/Aminoglikozidi.pdf> (26.7.2017)
24. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/tetraciklini> (16.7.2017)
25. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/sulfonamidi> (18.7.2017)
26. <http://www.pulmologija.hr/StrucniSadrzajLjecnici/ATLTBC.html> (18.7.2017)
27. <http://www.stetoskop.info/makrolidi-b13-bs143-p95-nc1-book.htm> (16.7.2017)
28. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Transpozon> (21.7.2017.)
29. [https://bs.wikipedia.org/wiki/Vi%C5%A1estruka\\_otpornost\\_na\\_lijekove](https://bs.wikipedia.org/wiki/Vi%C5%A1estruka_otpornost_na_lijekove) (21.7.2017)
30. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol#Resistance> (16.7.2017)