

Rezistencija na makrolidne antibiotike: usporedba mehanizama rezistencije u okolišnih i bolničkih patogena

Pole, Lucia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:286448>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



**REZISTENCIJA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE: USPOREDBA
MEHANIZAMA REZISTENCIJE U OKOLIŠNIH I BOLNIČKIH PATOGENA**

DIPLOMSKI RAD

Lucia Pole

Zagreb, siječanj, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Agroekologija: Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**REZISTENCIJA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE: USPOREDBA
MEHANIZAMA REZISTENCIJE U OKOLIŠNIH I BOLNIČKIH PATOGENA**

DIPLOMSKI RAD

Lucia Pole

Mentor: dr. sc. Nikolina Udiković Kolić

Komentor: izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić
Fuka

Zagreb, siječanj, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Lucia Pole, JMBAG 0178099143, rođena 09.08.1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

REZISTENCIJA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE: USPOREDBA MEHANIZAMA REZISTENCIJE U OKOLIŠNIH I BOLNIČKIH PATOGENA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice LUCIJE POLE, JMBAG 0178099143, naslova

**REZISTENCIJA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE: USPOREDBA MEHANIZAMA REZISTENCIJE U
OKOLIŠNIH I BOLNIČKIH PATOGENA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. dr. sc. Nikolina Udiković Kolić, mentor _____
2. izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka, komentor _____
3. izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković, član _____
4. doc. dr. sc. Ana Bielen, član _____
5. mag. educ. biol. et chem. Milena Milaković,
neposredni voditelj _____

ZAHVALA

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na iskazanom povjerenju, savjetima, pristupačnosti te podršci tijekom mog studiranja.

Također veliko hvala dr. sc. Nikolini Udiković Kolić na pruženoj prilici i suradnji te izdvojenom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se mag. educ. biol. et chem. Mileni Milaković, dr. sc. Steli Križanović te dr. sc. Ines Sviličić Petrić na velikoj pomoći, pruženom znanju, kao i na ugodno provedenom vremenu u laboratoriju.

Zahvaljujem se Ani Pošti i Antoniji Vrkljan što su fakultetske dane ispunile savjetima, velikom podrškom te prekrasnim uspomnama. Hvala ostalim prijateljima i kolegama što su bili uz mene.

Najveće hvala mojim roditeljima Damiru i Snježani te sestri Daliji na svim riječima ohrabrenja, savjetima i ljubavi tijekom svih godina studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Antibiotici	3
2.1.1. Mehanizmi djelovanja antibiotika	3
2.1.2. Makrolidni antibiotici.....	6
2.1.3. Antibiotici u okolišu	7
2.2. Rezistencija bakterija na antibiotike	9
2.2.1. Mehanizmi antibiotske rezistencije	10
2.2.2. Rezistencija na makrolidne antibiotike.....	11
2.2.3. Širenje antibiotske rezistencije	13
2.2.2.1. Praćenje rezistencije u bolnicama.....	13
2.2.2.2. Uloga okoliša u širenju rezistencije	13
2.2.2.3. Uloga farmaceutske industrije	14
3. HIPOTEZE	16
4. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
5. MATERIJALI	18
5.1. Priprema hranjivih podloga i otopina	18
5.1.1. R2A (<i>Reasoner's 2A agar</i>) čvrsta podloga s ekstraktom kvasca.....	18
5.1.2. Mueller-Hintonova čvrsta podloga s dodatkom selektivnog <i>Staph/Strepp</i> suplementa	18
5.1.3. Mueller-Hintonov bujon	18
5.1.4. Columbia čvrsta hranjiva podloga s dodatkom <i>Staph/Strepp</i> suplementa i konjske krvi	18
5.1.5. Columbia čvrsta hranjiva podloga s dodatkom konjske krvi.....	18
5.1.6. Priprema 1%-tnog agaroznog gela	19
5.2. Priprema korištenih otopina	19
5.2.1. Priprema fiziološke otopine	19
5.2.2. Priprema 0,5 McFarland standarda	19
5.2.3. Priprema 1 x tris-acetatnog EDTA pufera (TAE)	19
6. METODE	20
6.1. Uzorkovanje riječnog sedimenta	20
6.2. Izolacija bakterija rezistentnih na azitromicin iz sedimenta	20
6.3. Klinički bakterijski izolati uključeni u istraživanje	20
6.4. Izolacija ukupne bakterijske DNA	21

6.5. Identifikacija okolišnih i kliničkih izolata	21
6.6. Detekcija i karakterizacija gena za rezistenciju na makrolidne antibiotike	22
6.6.1. Detekcija odabranih gena PCR metodom	22
6.6.2. Sekvenciranje odabranih gena	24
6.7. Testiranje osjetljivosti izolata na antibiotike	24
7. REZULTATI	26
7.1. Identifikacija okolišnih i kliničkih izolata sekvenciranjem 16S rRNA gena	26
7.2. Identifikacija mehanizama makrolidne rezistencije detekcijom gena	28
7.2.1. Okolišni izolati	28
7.2.2. Klinički izolati	30
7.3. Fenotipske i genotipske karakteristike izolata rezistentnih na azitromicin	31
7.3.1. Okolišni izolati	31
7.3.2. Klinički izolati	34
7.3.3. Sekvenciranje gena <i>ermB</i> porijeklom iz okolišnih i kliničkih izolata.....	35
8. RASPRAVA	37
9. ZAKLJUČCI	42
10. LITERATURA	43

SAŽETAK

Rezistencija bakterija na antibiotike je jedan od vodećih problema današnje medicine, a smatra se da okoliš zagađen antibioticima pridonosi ovom problemu. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti mehanizme rezistencije na makrolidne antibiotike između skupine bakterijskih izolata porijeklom iz okoliša zagađenog makrolidima i skupine koju čine relevantni bakterijski patogeni (streptokoki i stafilokoki) iz hrvatskih bolnica. Sekvenciranjem umnoženog 16S rRNA gena utvrđena je veća raznolikost okolišnih bakterijskih izolata s lokacije ispusta industrijskih otpadnih voda u odnosu na uzvodnu lokaciju što upućuje na mogući unos bakterija putem otpadne vode i/ili selekciju bakterija iz sedimenta kao odgovor na visok selektivni pritisak makrolida. PCR detekcija gena za makrolidnu rezistenciju pokazala je da je u izolatima s lokacije ispusta došlo do povećanja zastupljenosti tri mehanizma rezistencije posredovana metiltransferazama (većinom geni *ermB* i *ermF*), zaštitnim proteinima ribosoma (uglavnom gen *msrE*) i fosfotransferazama (gen *mphE*) u usporedbi sa izolatima sa uzvodne (kontrolne) lokacije. Među analiziranim kliničkim izolatima najzastupljeniji mehanizam uključuje efluks pumpe, a slično kao u izolatima s lokacije ispusta, preostala dva dominantna mehanizma uključuju metiltransferaze i zaštitne proteine ribosoma. Iako je većinu analiziranih izolata odlikovao jedan mehanizam rezistencije na makrolide, u okolišnih izolata sa zagađene lokacije i kliničkih izolata zamijećena je pojava višestrukih mehanizama rezistencije kao jedan od načina prilagodbe i preživljavanja bakterija u okolišu s visokim koncentracijama antibiotika. Utvrđena visoka sličnost nukleotidnih sekvenci gena *ermB* koji je dominirao među izolatima iz zagađenog sedimenta i bolnica ukazuje na mogućnost širenja ovog gena izvan okoliša.

Ključne riječi: antibiotska rezistencija, mehanizmi rezistencije, okoliš, makrolidni antibiotici, otpadne vode, farmaceutska industrija, streptokoki, stafilokoki.

SUMMARY

Antibiotic resistance is one of the leading medical problems and it is believed that the environment contaminated with antibiotics contributes to this problem. The aim of this master thesis was to compare the mechanisms of resistance to macrolide antibiotics between bacterial isolates originating from the environment polluted with macrolides and clinically relevant bacterial pathogens (streptococci and staphylococci) from Croatian hospitals. 16S rRNA gene sequencing revealed higher diversity of environmental isolates originating from the discharge site of industrial wastewaters compared to the upstream (control) site, possibly due to input of wastewater bacteria and / or selection of bacteria from the sediment in response to the high selective pressure of macrolides. PCR detection of genes for macrolide resistance showed prevalence of three resistance mechanisms in isolates from the discharge site, which are mediated by ribosomal methyltransferases (mostly *ermB* and *ermF* genes), ribosomal protective proteins (mainly *msrE* gene) and macrolide phosphotransferases (*mphE* gene) compared to the isolates from the upstream site. Among the analyzed clinical isolates, the most common mechanism was efflux pumps, and similar to the isolates from the discharge site, other two dominant mechanisms included ribosomal methyltransferases and ribosomal protective proteins. Although most isolates had one mechanism of resistance to macrolides, environmental isolates from polluted site and clinical isolates possessed multiple resistance mechanisms possibly as the way of adaptation and survival of the bacteria in the environment with high concentrations of antibiotics. High similarity of nucleotide sequences of *ermB* gene between environmental isolates from polluted site and clinical isolates indicates the possibility of spreading of this gene outside the environment.

Keywords: antibiotic resistance, resistance mechanisms, environment, macrolides, wastewater, pharmaceutical industry, streptococci, staphylococci.

1. UVOD

Otkriće antibiotika i njihova klinička primjena smatra se jednim od najvećih postignuća medicine prošlog stoljeća. Međutim, nerazumna primjena u humanoj i veterinarskoj medicini te prekomjerno ispuštanje antibiotika u okoliš dovelo je do gubitka djelotvornosti tih dragocjenih lijekova (Peterson i Kaur, 2018; Marathe i sur., 2013). Zahvaljujući sposobnosti brze prilagodbe okolišu u kojem žive, bakterije su do danas razvile mehanizme rezistencije na gotovo sve grupe antibiotika, a do novih antibiotika se sve teže dolazi. Iz tog razloga rezistencija bakterija na antibiotike koji se primjenjuju u liječenju ljudi i životinja predstavlja jedan od vodećih problema današnje medicine na globalnoj razini (Gaze i Depledge, 2017).

Dobro je poznata činjenica da pojedini mikroorganizmi u prirodnom okolišu proizvode antibiotike uslijed kompeticije s drugim mikroorganizmima te stoga posjeduju urođenu ili intrinzičnu rezistenciju na antibiotike kako bi sami sebe zaštitili. Takva urođena rezistencija može biti posljedica nedostatka ciljnog mjesta za vezanje antibiotika, nemogućnosti ulaska antibiotika u bakterijsku stanicu ili pojačanog izbacivanja iz stanice te proizvodnje enzima koji inaktiviraju antibiotik (Abram, M. i sur., 2018). Osim urođene rezistencije, bakterije mogu steći rezistenciju novim mutacijama u genima i horizontalnim prijenosom gena (Blair i sur., 2015). Kontinuirano zagađenje okoliša antibioticima pospješilo je ove procese i dovelo do umnožavanja bakterija rezistentnih na antibiotike (Thomas i Nielsen, 2005). Smještaj gena za rezistenciju na antibiotike na pokretnim genetičkim elementima, kao što su primjerice plazmidi, omogućio je širenje ovih gena među bakterijama, uključujući patogene bakterije. S obzirom na to da čovjek stalno izmjenjuje svoju mikrobiotu s okolišnom, razvoj rezistencije u okolišu povećava rizik prijenosa rezistentnih patogena na ljude. Tome u prilog idu i studije koje su pokazale identične mehanizme rezistencije u okolišnih (nepatogenih) i bolničkih (patogenih) bakterija (Surette i Wright, 2017). Zato je u borbi protiv širenja rezistencije na antibiotike, pored praćenja rezistencije u bolničkim sredinama, neophodno rezistenciju pratiti i u okolišu. Međutim, usprkos tome, još uvijek u svijetu i u Hrvatskoj ne postoje programi kojima bi se rezistencija pratila u okolišu, posebice okolišu visokog rizika za daljnje širenje rezistencije unutar i izvan njega.

Do danas se relativno malo zna o važnosti vodenog okoliša kao rezervoara mikroorganizama rezistentnih na antibiotike koji mogu uzrokovati bolesti u ljudi. Istraživanja su pokazala da je vodeni okoliš koji služi kao recipijent otpadnih voda iz postrojenja za proizvodnju antibiotika značajan izvor rezistentnih mikroorganizama. Naime, otpadne vode iz industrijskih postrojenja mogu sadržavati smjese antibiotika u visokim koncentracijama, ali i druga zagađivala koja potiču razvoj antibiotske rezistencije, poput teških metala te bakterije rezistentne na antibiotike (Larsson, 2014; Li i sur., 2009; Li i sur., 2010).

Zbog toga se smatra da vodeni okoliš koji je pod utjecajem ovakvog otpada, naročito sedimenti, predstavlja jedinstvene "vruće točke" u smislu da sadrži specifične mikroorganizme koji žive pod selektivnim pritiskom dugotrajne izloženosti antibioticima, a s kojima bi se u budućnosti mogli susresti u bolnicama. Putevi kojima ljudi mogu doći u kontakt s tim

rezistentnim bakterijama su brojni. Oni uključuju konzumaciju vode porijeklom iz zagađene podzemne ili površinske vode, sudjelovanje u rekreativnim aktivnostima u zagađenoj površinskoj vodi ili inhalacija aerosola (Pruden i sur., 2013).

Prethodna istraživanja (Bielen i sur., 2017; Milaković i sur., 2019) potvrdila su visoke koncentracije makrolidnih antibiotika i bakterija rezistentnih na te antibiotike u otpadnim vodama farmaceutske industrije Pliva, kao i u uzorcima sedimenta iz rijeke Save koja služi kao recipijent tih otpadnih voda. Nadalje, količina gena za rezistenciju na makrolide i druge skupine antibiotika, kao i pokretnih genetičkih elemenata kao što integroni skupine I. i plazmidi također je znatno povećana u izloženoj bakterijskoj populaciji u sedimentu rijeke Save (Gonzalez-Plaza i sur., 2019, Milaković i sur., 2019). Ove spoznaje ukazale su na značajan doprinos lokalne farmaceutske industrije problemu zagađenja okoliša antibioticima i rezistentnim determinantama (bakterije, geni, pokretni genetički elementi), što s jedne strane ugrožava zdravlje okoliša, ali također predstavlja i rizik za zdravlje ljudi zbog mogućeg širenja rezistencije izvan okoliša.

U ovom radu su po prvi puta provedena istraživanja s ciljem usporedbe rezistencije na makrolidne antibiotike između skupine okolišnih bakterija porijeklom iz sedimenta rijeke Save zagađenog makrolidima i skupine klinički relevantnih patogena rezistentnih na makrolide koji su prikupljeni u Referentnom centru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Identifikacija okolišnih izolata do razine vrste ili roda provedena je sekvenciranjem 16S rRNA gena, a testiranje njihove osjetljivosti na makrolide i ostale skupine antibiotika provedeno je određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija. Mehanizmi rezistencije na makrolide identificirani su PCR detekcijom specifičnih gena u ukupnoj DNA iz svih analiziranih izolata. Gen *ermB* koji je dominirao među okolišnim izolatima iz zagađenog sedimenta i kliničkim izolatima odabran je za detaljniju analizu sekvenciranjem kako bi se dobio uvid u potencijalnu sličnost sekvenci iz ove dvije skupine izolata.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Antibiotici

Otkriće antibiotika jedno je od najznačajnijih postignuća moderne medicine, jer je njihova uporaba uvelike pridonijela poboljšanju zdravlja ljudi i životinja, produljenju životnog vijeka i povećanju kvalitete života (D'Costa i sur., 2011). Antibiotici su kemijski spojevi koji djeluju na mikroorganizme, točnije bakterije, tako da ih ubijaju (baktericidno djelovanje) ili sprječavaju njihov rast (bakteriostatsko djelovanje) (Walsh i Wencewicz, 2016). Njihovo glavno obilježje je što su selektivno toksični, odnosno toksični su za bakterije, dok su netoksični za ljudski organizam. Većina antibiotika koja se primjenjuje u liječenju različitih bakterijskih infekcija u posljednjih 60 godina je prirodnog porijekla, a najveću skupinu prirodnih proizvođača antibiotika čine aktinomicete. Osim prirodno dobivenih antibiotika, postoje antibiotici koji se dobivaju u potpunosti sintetičkim postupkom u laboratoriju ili polusintetičkim postupkom, odnosno dodatnom kemijskom modifikacijom prirodnih antibiotika (Walsh, 2003). S obzirom na širinu djelovanja razlikuju se antibiotici širokog spektra djelovanja te oni s užim spektrom djelovanja.

2.1.1. Mehanizmi djelovanja antibiotika

Različite strukture antibiotika uvjetuju i različite mete odnosno mehanizme djelovanja (Walsh, 2003). Prepoznato je pet osnovnih mehanizama djelovanja antibiotika na bakterije, prikazanih na Slici 1., a to su:

1) inhibicija sinteze nukleinskih kiselina

Antibiotici koji ovako djeluju inhibiraju enzime u biosintetskom putu nukleinskih kiselina što dovodi do inhibicije nastanka prokariotske RNA i DNA. Fluorokinoloni primjerice djeluju tako da inhibiraju bakterijske enzime topoizomeraze čime onemogućavaju transkripciju i replikaciju DNA (Espelli i Mariani, 2004). Rifampicin inhibira DNA ovisnu RNA-polimerazu te posljedično nastanak RNA (Walsh i Wencewicz, 2016).

2) inhibicija sinteze stanične stjenke

Ovaj mehanizam djelovanja karakterističan je za antibiotike iz skupine β -laktama i glikopeptida. Bakterije imaju staničnu stjenku građenu od kompleksnih polimera peptidoglikana (N-acetilmuraminske kiseline i N-acetilglukozamina) koji su međusobno povezani peptidnim lancima. Aktivirajući enzime koji kidaju peptidne veze peptidoglikana gore spomenuti antibiotici dovode do degradacije stanične stjenke (Höltje, 1998, Kahne i sur., 2005).

3) inhibicija sinteze proteina

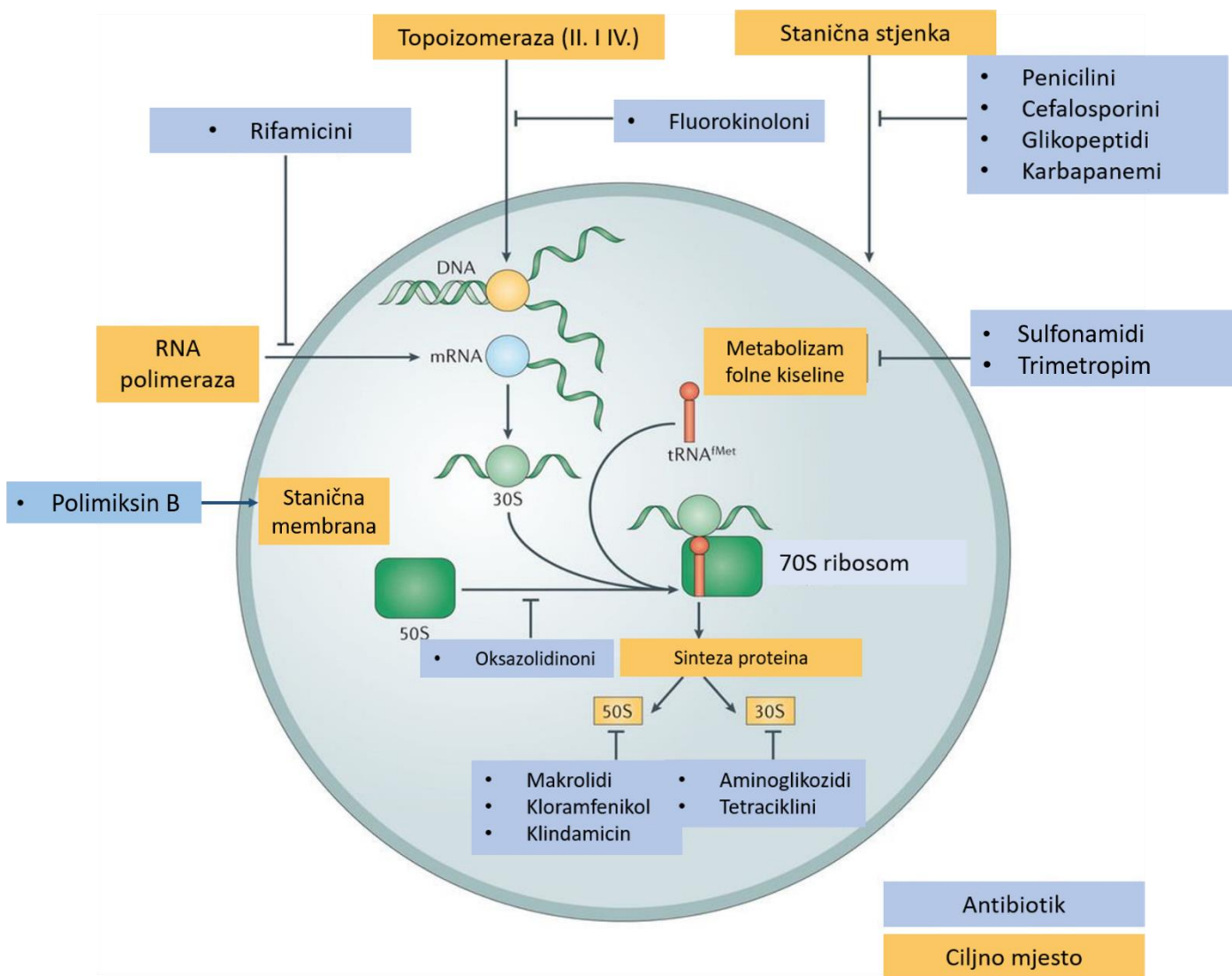
Ovo je mehanizam djelovanja velikog broja antibiotika koji pripadaju skupinama aminoglikozida, tetraciklina, makrolida, streptogramina i fenikola. Meta djelovanja je isključivo bakterijski ribosom (70S), a ne ribosom sisavaca (80S) čime ovi antibiotici djeluju selektivno toksično na bakterije, ali ne i na čovjeka. Sinteza proteina se odvija na ribosomima u tri osnovne faze: inicijacija, elongacija, terminacija. Pritom različiti antibiotici inhibiraju različite korake u sintezi proteina. Tako primjerice tetraciklini blokiraju vezanje aminoacil-tRNA na ribosomu, aminoglikozidi uzrokuju pogrešno čitanje genetičkog koda na ribosomima dok makrolidi inhibiraju aktivnost peptidil-transferaznog centra koji je odgovoran za stvaranje peptidne veze između aminokiselina (Johnston i sur., 2005; Kohanski i sur., 2010).

4) blokiranje metaboličkih puteva

Ovaj mehanizam djelovanja je karakterističan za sulfonamide i trimetropim. Spomenuti antibiotici inhibiraju sintezu folne kiseline koja je bakterijama neophodna prilikom sinteze DNA (Yoneyama i Katsumata, 2006). Sulfonamidi inhibiraju konverziju *p*-aminobenzoične kiseline u dihidropteroat, koji bakterije trebaju za sintezu folne kiseline, a trimetropim sprječava redukciju dihidrofolata u tetrahidrofolat (Kapoor i sur., 2017).

5) povećanje propusnosti stanične membrane

Ovaj mehanizam djelovanja temelji se na vezanju antibiotika na specifične komponente u staničnoj membrani. Ovako djeluju primjerice polimiksin B i kolistin, koji pripadaju polipeptidima i vežu se na fosfatne skupine fosfolipida u staničnoj membrani povećavaju njezinu propusnost. Polipeptidi uzrokuju zamjenu magnezijevih i kalcijevih iona u lipopolisaharidima što dovodi do destabilizacije stanične membrane, a na kraju rezultira povećanjem propusnosti, dolazi do gubljenja staničnog sadržaja, a na kraju i do smrti bakterijske stanice (Falagas i Kasiakou, 2005).



Slika 1. Mehanizmi djelovanja antibiotika. Preuzeto i prilagođeno od Lewis (2013).

2.1.2. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici su poliketidna skupina spojeva koji se često primjenjuju za liječenje zaraznih bolesti, naročito infekcija dišnog sustava (Eeraković Haber, 2011). Oni selektivno djeluju tako da se reverzibilno vežu na bakterijske ribosome (50S podjedinicu) i sprječavaju sintezu proteina inhibirajući aktivnost peptidil-transferaznog centra, odnosno mjesta gdje se odvija kataliza stvaranja peptidnih veza (Cattoir i Leclercq, 2017). Najčešće na stanicu djeluju bakteriostatski, ali mogu djelovati i baktericidno, što je više izraženo kod novih generacija makrolida kao što su klaritromicin ili rokitamicin (Omura, 2002; Seral i sur., 2003). Djeluju uglavnom na Gram-pozitivne bakterije, a puno slabije na Gram-negativne bakterije. Većina Gram-negativnih bakterija je prirodno (urođeno) otporna na makrolide, jer oni teško prodiru kroz njihovu staničnu stjenku.

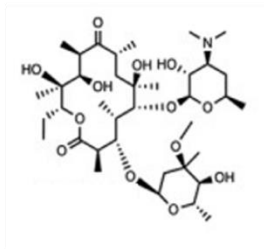
Kao što je prikazano na Slici 2., medicinski važni makrolidi u svojoj strukturi sadrže veliki 14-, 15- ili 16- erolančani makrociklički laktonski prsten na koji su vezani šećeri; obično kladinoza i dezozamin (Fyfe i sur., 2016; Zukerman, 2004). Eritromicin A je glavni predstavnik 14-erolančanih makrolida i prvi prirodni makrolidni antibiotik koji je imao kliničku primjenu, a izoliran je iz bakterije *Streptomyces erythraeus* 1952. godine (Zhanel i sur., 2001). Međutim, nepovoljne karakteristike eritromicina A, kao što su razgradnja u kiselom mediju želuca i posljedično gubitak antibakterijskog djelovanja, rezultirale su pripremom druge generacije makrolida, odnosno polusintetskih derivata eritromicina A sa širim spektrom djelovanja, boljim farmakološkim svojstvima i bioraspoloživosti (Dinos, 2017; Zukerman, 2004).

Glavni predstavnik druge generacije 14-eročlanih makrolida je klaritromicin, dok je azitromicin glavni predstavnik makrolida s 15-eročlanim prstenom (Slika 2.) Azitromicin je sintetiziran 1980. godine od strane hrvatskog tima znanstvenika u tvornici lijekova Pliva, a proizvodi se i dan danas u istoj tvornici u Savskom Marofu. Azitromicin karakterizira širok spektar djelovanja koji osim Gram pozitivnih koka (streptokoki i stafilokoki) uključuje i Gram-negativne patogene kao što su *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Radi jednodnevnog doziranja, akumulacije visokih tkivnih i staničnih koncentracija, mogućnosti primjene u trudnoći i kod djece, azitromicin je jedan od najprodavanijih lijekova u svijetu. Propisuje se kod odraslih za liječenje kroničnog bronhitisa, upale pluća uzrokovanih bakterijama *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Streptococcus pneumoniae*, te upala ždrijela i tonzila uzrokovanih bakterijom *Streptococcus pyogenes*. Također, propisuje se i kod blažih infekcija kože i mekih tkiva uzrokovanih vrstama *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus agalactiae*, kod infekcija uretre i grlića maternice uzrokovanih bakterijama *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Haemophilus ducreyi*, te kao profilaksa protiv malarije (Eeraković Haber, 2011).

Makrolidi druge generacije sa 16- eročlanim laktonskim prstenom, predvođeni tilozinom (Slika 2.), također predstavljaju značajnu skupinu antibiotika te se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog sve veće bakterijske rezistencije na makrolidne antibiotike razvijena je i treća

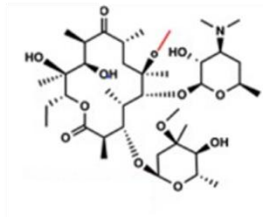
generacija makrolida koju čine ketolidi. Oni u svojoj strukturi imaju karbonilnu skupinu na C-3 atomu laktorskog prstena umjesto šećera kladinoze. Osim toga, ketolidi sadrže i druge modifikacije uključujući vezanje cikličkog karbamata i alkil-arilnog lanca na laktoski prsten (Dinos, 2017; Katz i Ashley, 2005). Jedini ketolid koji se danas koristi u liječenju je telitromicin, i njegova struktura je prikazana na Slici 2. (Farrell i sur., 2016).

1. GENERACIJA MAKROLIDA



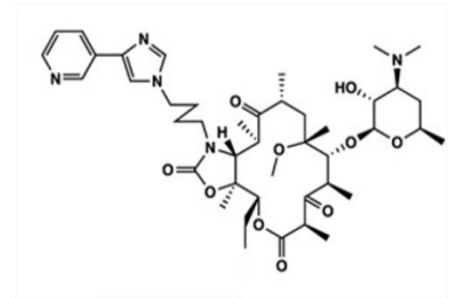
14- eročlani eritromicin A

2. GENERACIJA MAKROLIDA

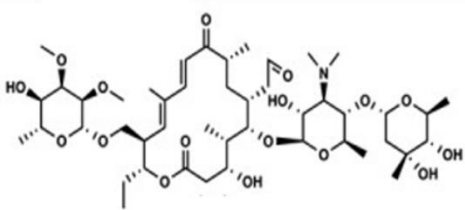


14- eročlani klaritromicin

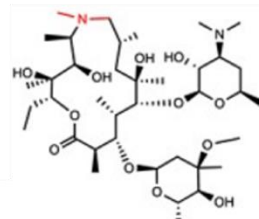
3. GENERACIJA MAKROLIDA (KETOLIDI)



telitromicin



16- eročlani tilozin



15- eročlani azitromicin

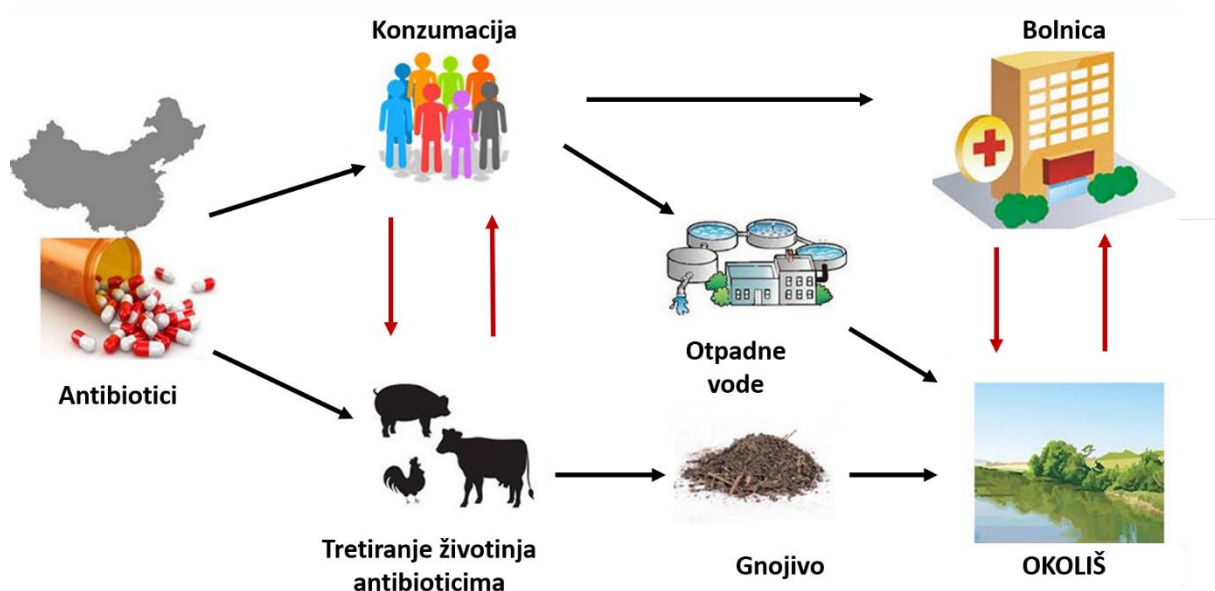
Slika 2. Strukturne formule nekih makrolidnih antibiotika. Preuzeto i prilagođeno od Dinos (2017).

2.1.3. Antibiotici u okolišu

Povećana proizvodnja i masivna potrošnja antibiotika u humanoj medicini, stočarstvu i poljoprivredi dovela je do unosa velikih količina antibiotika u okoliš. To je, s jedne strane, ugrozilo zdravlje okoliša zbog toksičnih učinaka antibiotika na okolišne organizme, a s druge strane predstavlja potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi zbog razvoja rezistentnih bakterijskih populacija, uključujući i patogene koje se mogu prenijeti na ljude (Surette i Wright, 2017). No, važno je istaknuti da za razliku od klasičnih prioriternih zagađivala čije je unošenje u okoliš ograničeno propisima, zakonska regulativa o dozvoljenim koncentracijama antibiotika u okolišu i otpadnim vodama još uvijek nije propisana te nije predviđeno njihovo stalno praćenje u okolišu (Grenni i sur., 2018). Međutim, istraživanja su potvrdila da čak i vrlo niske, sub-inhibitorne koncentracije antibiotika, koje se često detektiraju u prirodnim vodama, mogu

potaknuti razvoj rezistencije među bakterijama i tako potencijalno ugroziti zdravlje ljudi (Gullberg i sur., 2011).

Kao što je prikazano na Slici 3., antibiotici dopijevaju u okoliš na nekoliko načina, uključujući ispuštanje komunalnih i industrijskih otpadnih voda u prirodne vodotokove, gnojenje poljoprivrednih površina stajskim gnojem, direktnu aplikaciju na biljke te neprikladno odlaganje neiskorištenih antibiotika ili onih kojima je istekao rok trajanja (Qiao i sur., 2018). Nakon uzimanja antibiotika, određena se količina metabolizira u tijelu, dok se veći dio antibiotika nepromijenjen izlučuje iz tijela putem urina ili fecesa. Na taj način tragovi antibiotika i njihovih metabolita dopijevaju u komunalne otpadne vode i životinjski gnoj (Gaze i Depledge, 2017). Komunalne otpadne vode odlaze na uređaje za pročišćavanje otpadne voda gdje se antibiotici općenito slabo ili nepotpuno uklanjaju, pa se zadržavaju u obrađenoj otpadnoj vodi i ispuštaju u prirodne vode, najčešće rijeke (Göbel i sur., 2005; Le-Minh i sur., 2010; Xu i sur., 2007).



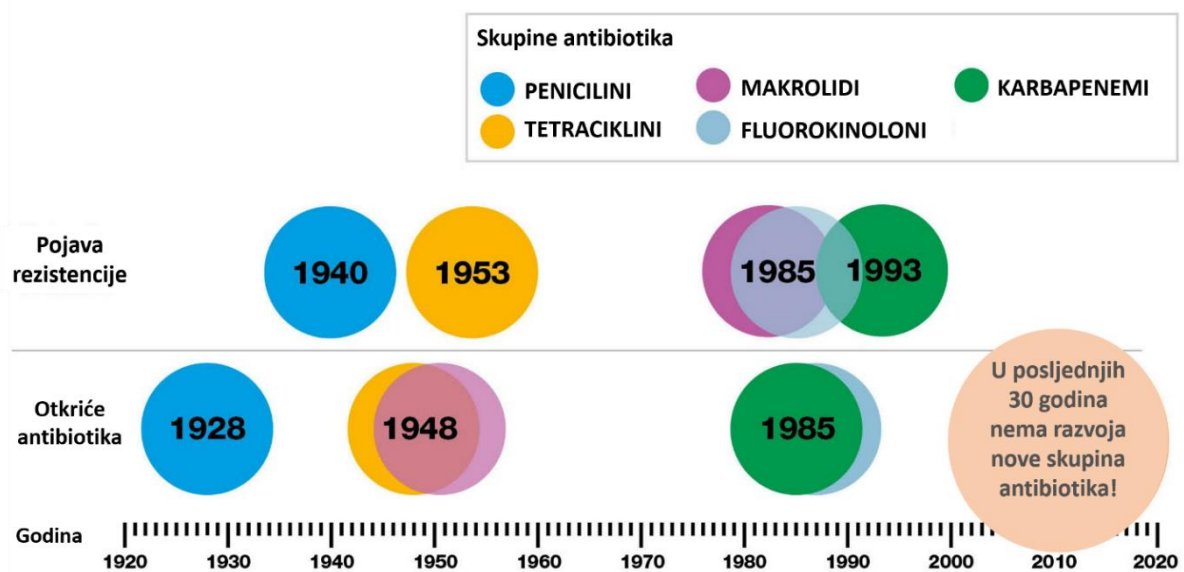
Slika 3. Načini unosa i širenja antibiotika te bakterija/gena za rezistenciju na antibiotike u okolišu. Preuzeto i prilagođeno od Qiao i sur. (2018).

Za razliku od komunalnih otpadnih voda u kojima su antibiotici često zastupljeni u niskim ($\mu\text{g/L}$) koncentracijama, istraživanja su pokazala da otpadne vode iz pogona za proizvodnju antibiotika u azijskim zemljama poput Indije i Kine mogu sadržavati vrlo visoke koncentracije antibiotika mjerene u mg/L (Šimatović i Udiković-Kolić, 2019). Ispust tako zagađenih otpadnih voda doveo je do zagađenja površinskih i podzemnih, pa i pitkih voda antibioticima (Fick i sur., 2009) te posljedično, do toksičnih učinaka na vodene organizme (Carlsson i sur., 2009). Uz to, istraživanja su pokazala da ispuštavanje ovako zagađenih industrijskih otpadnih voda dovodi do

obogaćenja rezistentnih determinanti u recipijentnom okolišu uključujući bakterije, gene i pokretne genetičke elemente kao što su plazmidi (Bengtsson-Palme i sur., 2014; Kristiansson i sur., 2011; Marathe i sur., 2013;). Međutim, ovakvo zagađenje okoliša putem farmaceutskih otpadnih voda nije ograničeno samo na azijske zemlje, već se u manjem opsegu pojavljuje i u Europi (Sidrach-Cardona i sur., 2014), uključujući i Republiku Hrvatsku (Bielen i sur., 2017; Milaković i sur., 2019). Naime, Bielen i sur. (2017) dokazali su da otpadne vode iz hrvatske farmaceutske industrije Pliva koja proizvodi antibiotik azitromicin i koje se ispuštaju u rijeku Savu, sadrže visoke koncentracije makrolida azitromicina (do 3,8 mg/L) i eritromicina (do 2 mg/L). Posljedično, oba makrolida su detektirana u povišenim koncentracijama (ukupno 20-30 µg/L) u rijeci Savi nizvodno od ispusta u usporedbi s kontrolnom lokacijom uzvodno od ispusta. U narednom istraživanju, Milaković i sur. (2019) dokazali su da su ti ispusti također doveli do onečišćenja sedimenta rijeke Save makrolidnim antibioticima, naročito azitromicinom, čija je koncentracija na mjestu ispusta dosegala gotovo 23 mg/kg sedimenta. Zapažena akumulacija makrolida u sedimentu ukazala je na mogućnost razvoja i širenja rezistencije na makrolidne antibiotike u rijeci Savi.

2.2. Rezistencija bakterija na antibiotike

Rezistencija bakterija na antibiotike je svojstvo bakterija da se obrane protiv prisutnosti antibiotika u svojem okolišu. Iako je ovaj fenomen poznat još od samog početka razvoja antibiotika, unatrag dvadesetak godina zabrinjavajuće raste prvenstveno zbog prekomjerne upotrebe antibiotika. Kao što je vidljivo na Slici 4., pri svakom uvođenju novog antibiotika u kliničku primjenu dolazi do pojave rezistencije bakterija na taj antibiotik, a brzina pojave rezistencije varira od nekoliko mjeseci do godina.



Slika 4. Prikaz razvoja antibiotske rezistencije. Preuzeto i prilagođeno od Newton i Fenton (2015).

Do razvoja rezistencije dolazi zbog adaptacije bakterija na uvjete okoliša i zahvaljujući upravo brzom prilagodbi, bakterije su do danas razvile mehanizme rezistencije na gotovo sve skupine antibiotika koji se sistemski upotrebljavaju u humanoj i veterinarskoj medicini zbog čega oni postaju neučinkoviti u liječenju. Takva moć bakterijske evolucije, zajedno s ograničenim investiranjem farmaceutske industrije u razvoj novih antibiotika, učinili su antibiotičku rezistenciju jednom od najozbiljnijih prijetnji modernom zdravlju u 21. stoljeću. Bakterije mogu biti prirodno (urođeno) rezistentne na neke antibiotike, ali mogu i steći rezistenciju novim mutacijama u genomu i horizontalnim prijenosom gena, što je posebno olakšano za gene koji se nalaze na plazmidima (Coates i sur., 2002; Munita i Arias, 2016).

2.2.1. Mehanizmi antibiotičke rezistencije

Postoje četiri osnovna mehanizama kojima se bakterije nastoje zaštititi od djelovanja antibiotika (Slika 5.), a to su:

1) modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika

Ovo je jedan od najčešćih mehanizama rezistencije kojim se ciljno mjesto djelovanja antibiotika mijenja ili nestaje te se na taj način onemogućava vezanje antibiotika i štiti bakterija od njegovog štetnog djelovanja (Munita i Arias, 2016).

2) promjena metaboličkog puta

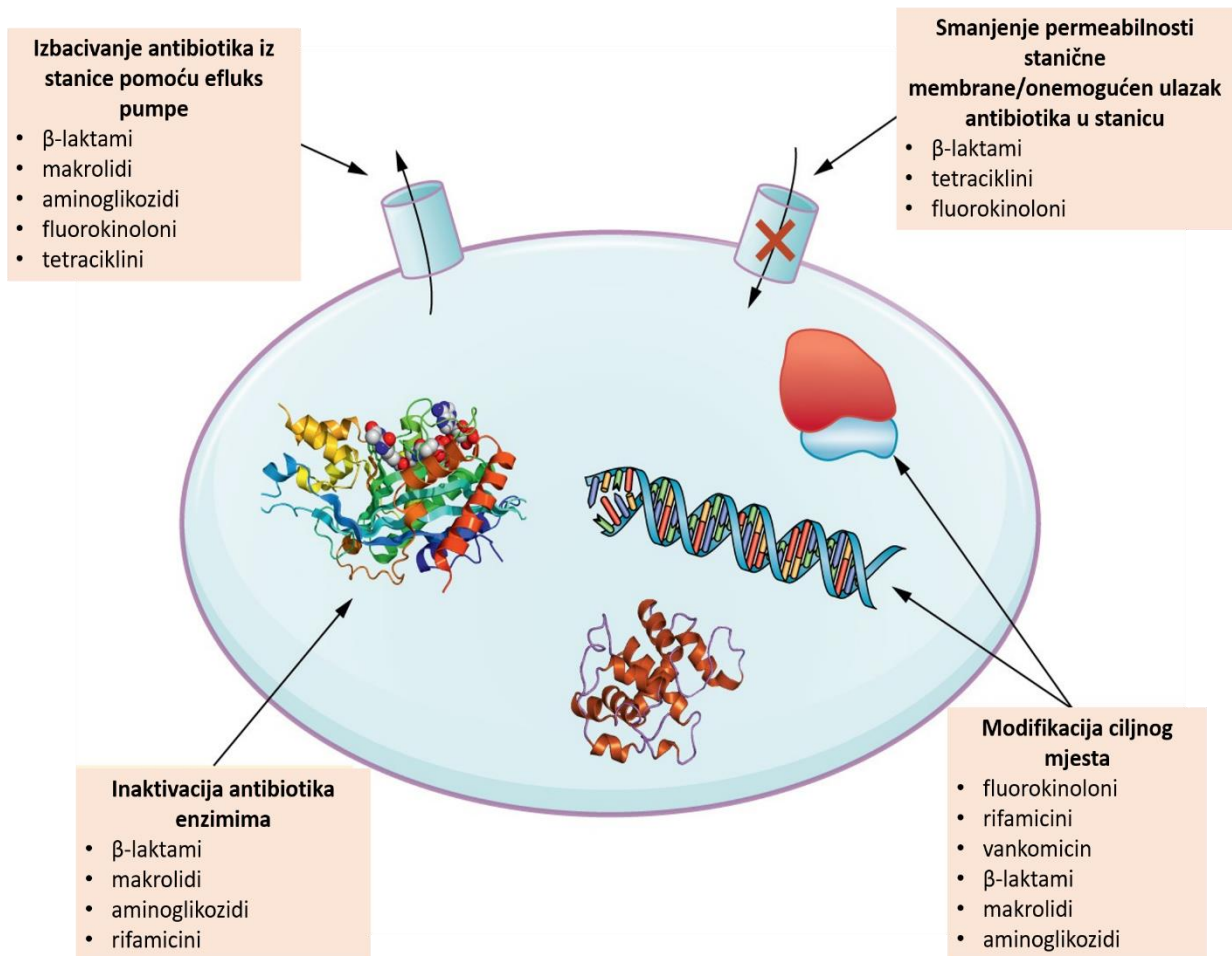
Rezistentne bakterije zaobilaze metabolički put na koji djeluje antibiotik i stvaraju novi, alternativni put (Munita i Arias, 2016).

3) smanjenje permeabilnosti stanične membrane ili aktivno izbacivanje antibiotika

Smanjenjem permeabilnosti membrane onemogućen je ulazak antibiotika u stanicu, a pomoću efluks pumpi bakterije aktivno izbacuju antibiotik iz stanice (Munita i Arias, 2016; Pagès i sur., 2008).

4) inaktivacija antibiotika

Bakterije proizvode enzime koji mijenjaju ili razgrađuju molekule antibiotika te oni gube svoje djelovanje (Ramirez i Tolmasky, 2010).



Slika 5. Mehanizmi rezistencije na antibiotike. Preuzeto i prilagođeno od Wright (2011).

2.2.2. Rezistencija na makrolidne antibiotike

Svi antibiotici koji pripadaju skupini makrolida inhibiraju sintezu proteina na način da se vežu na 23S rRNA regiju koja se nalazi na velikoj podjedinici (50S) ribosoma (Fyfe i sur., 2016). Rezistencija na makrolide moguća je na slijedeća četiri načina:

1) modifikacije na ribosomu

Uključuju promjenu u mjestu vezanja makrolida. Najčešći mehanizam modifikacije ribosomskog mjesta vezanja makrolida je metilacija 23S rRNA pomoću enzima metiltransferaza što dovodi do smanjenog vezanja makrolida na ribosom zbog steričkih smetnji (Dinos, 2017). Ove metiltransferaze kodiraju geni iz skupine *erm* i do sada je identificirano 38 *erm* gena među kojima su najčešći geni *ermB*, *ermC* i *ermF* (Fyfe i sur., 2016). Osim navedenih metilacija, ovaj mehanizam rezistencije uključuje i mutacije 23S rRNA te nekih ribosomskih proteina.

2) enzimski posredovana kemijska modifikacija makrolida

Spriječeno je vezanje makrolida na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma (Fyfe i sur., 2016). Poznate su dvije klase enzima koje modificiraju makrolide i sudjeluju u stvaranju rezistencije, a to su makrolidne fosfotransferaze i makrolidne esteraze. Makrolidne fosfotransferaze fosforiliraju specifičnu hidroksilnu grupu makrolidnog prstena, a prisutne su u velikom broju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Roberts, 2008). Najčešće ih kodiraju geni iz skupine *mph* lokalizirani na plazmidima, uključujući *mphA*, *mphB*, *mphC*, *mphD*, *mphE* te relativno novo identificirani gen *mphG* (Noguchi i sur., 1998; Nonaka i sur., 2015; Taniguchi i sur., 1999). Makrolidne esteraze hidroliziraju estersku vezu u laktonskom prstenu pri čemu lineariziraju makrolid, koji se tada više ne može vezati na ribosom (Morar i sur., 2012). Geni *ereA* i *ereB* su prvi otkriveni geni koji kodiraju za makrolidne esteraze, a determinirani su kliničkom soju vrste *Escherichia coli* (Ounissi i Courvalin, 1985; Arthur i sur., 1986). Osim spomenutih, za makrolidne esteraze kodiraju još geni *ereA2*, *ereC* i *ereD*, s tim da se gen *ereD* nalazi na kromosomu, dok su ostali geni iz *ere* skupine lokalizirani na pokretnim genetičkim elementima (Golkar i sur., 2018; Xing i sur., 2015).

3) aktivno izbacivanje makrolida iz stanice putem proteinskih transportera (tzv. efluks pumpi)

Ovaj mehanizam je jedan od najčešćih mehanizama rezistencije na makrolidne antibiotike pri čemu je od osobite važnosti Mef obitelj pumpi koje kodiraju geni iz skupine *mef*. Ti se geni uglavnom nalaze u Gram-pozitivnim bakterijama, iako su detektirani i u nekim Gram-negativnim vrstama (Ojo i sur., 2004). Glavni predstavnici Mef pumpi su MefA i MefE pumpe kodirane genima *mefA* i *mefE* koji se nalaze na različitim pokretnim genetičkim elementima, najčešće transpozonomima i uglavnom uzrokuju rezistenciju na 14-eročlane i 15-eročlane makrolide, ali ne i na 16-eročlane (Valardo i sur., 2009). Osim *mefA* i *mefE*, za efluks pumpe kodiraju i geni *mefB* i *mefC* koji su smješteni na plazmidima (Liu i sur., 2009; Nonaka i sur., 2015).

4) zaštita veznog mjesta na ribosomu

Posredovana je proteinima koji se vežu za ribosom čime sprječavaju vezanje antibiotika (Sharkey i sur., 2016; Wilson, 2016). Geni iz skupine *msr* su odgovorni za sintezu zaštitnih proteina, a posebno se ističu geni *msrA*, *msrC*, *msrD* i *msrE* koji su odgovorni za rezistenciju na 14-eročlane i 15-eročlane makrolide (Vimberg i sur., 2015).

Osim navedenih glavnih mehanizama koji se pojavljuju kod bakterija rezistentnih na makrolide, nedavno je opisan novi mehanizam makrolidne rezistencije koji je posredovan ekspresijom specifičnih tzv. GTP-aza vezujućih proteina koje kodira gen *hflX*. Smatra se da navedeni protein reagira s molekulom makrolida vezanom na ribosomu i izbacuje ju iz njezinog veznog mjesta, dopuštajući da se ribosom ponovno uključi u sintezu staničnih proteina (Duval i sur., 2018). Duval i sur. (2018) navode da je taj gen odgovoran za rezistenciju na eritromicin i da je dominantan kod bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes*, a izoliran je iz važnih patogena kao što su *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* i *Clostridium difficile*.

2.2.3. Širenje antibiotske rezistencije

2.2.2.1. Praćenje rezistencije u bolnicama

Smatra se da je glavni pokretač rezistencije bakterija na antibiotike pretjerana i neadekvatna potrošnja antibiotika u humanoj medicini pa je većina dosadašnjih istraživanja o pojavi i širenju rezistencije uglavnom bila usmjerena na kliničke izolate. Najveća količina antibiotika u humanoj medicini troši se za infekcije dišnih puteva, najčešćih infekcija kod ljudi, većinom uzrokovanih virusima te u manjem opsegu i bakterijskim vrstama poput *Streptococcus pyogenes* (β -hemolitički streptokok grupe A), *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) i *Haemophilus influenzae*. Podaci o rezistenciji lokalnih bakterija su prijeko potrebni kao polazišna točka za sve intervencije usmjerene ka kontroli razvoja i daljnjeg širenja rezistentnih sojeva (Tambić Andrašević, 2007).

U Hrvatskoj se rezistencija na antibiotike prati u bolničkim sredinama kroz redovitu aktivnost Nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike, a izolati koji se analiziraju dolaze iz svih kliničkih materijala. Izolati rijetkog ili neuobičajenog fenotipa, kao što su na primjer, pneumokoki rezistentni na makrolide, šalju se u Referentni centar Ministarstva zdravlja za praćenje rezistencije na antibiotike osnovan 2003. godine pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Tako je primjerice, u Hrvatskoj u 2017. godini, stopa rezistencije pneumokoka na makrolide iznosila visokih 32%, a β -hemolitičkog streptokoka grupe A 7% (Tambić Andrašević i sur., 2017). Kod infekcija uzrokovanih β -hemolitičkim streptokokom grupe A, makrolidi se daju kao alternativa penicilinu u osoba preosjetljivih na penicilin, no stečena rezistencija na makrolide može ugroziti ishod terapije. Stoga su poseban problem sojevi koji su istodobno rezistentni i na penicilin i na makrolide.

2.2.2.2. Uloga okoliša u širenju rezistencije

Pojedine bakterije prisutne u okolišu (voda, tlo) ispoljavaju rezistenciju na određene antibiotike zbog posjedovanja urođenih mehanizama rezistencije. Tako je primjerice, *Escherichia coli* urođeno rezistentna na makrolide zbog posjedovanja efluks pumpi koje izbacuju te antibiotike iz stanice (Gomes i sur., 2017). Nadalje, enterokoki imaju urođenu rezistenciju na cefalosporine zbog nedostatka specifičnih proteina u peptidoglikanu staničnog

zida na koje se ovi antibiotici vežu (Murray, 1990; Vesić i Kristich, 2012). Međutim, bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotik mutacijom u genima ili češće, horizontalnim prijenosom gena ako se u bakterijsku stanicu nasumično unese pokretni genetički element (npr. plazmid) koji nosi gene za rezistenciju. Pokazalo se da sve veće onečišćenje okoliša antibioticima potiče ove procese, posebice plazmidni prijenos gena među bakterijama (Gonzalez-Plaza i sur., 2019; Milaković i sur., 2019). Prema tome, antropogeni unos antibiotika u okoliš pogoduje razvoju i širenju rezistencije među bakterijama, kako bezopasnim (komezalnim) tako i patogenim bakterijama koje se mogu proširiti izvan okoliša i ugroziti uspjeh liječenja bakterijskih infekcija (Gaze i Depledge, 2017).

Otpadne vode iz bolnica, kuća, farmi i farmaceutskih industrija sadrže ne samo antibiotike, već i bakterije rezistentne na te antibiotike koji potječu iz ljudskih i životinjskih sekreta. Budući da se te otpadne vode iz postrojenja za obradu otpadnih voda ispuštaju u prirodne vodotokove, najčešće rijeke, upravo su prirodne vode prepoznate kao rezervoari rezistencije i žarišta za daljnje širenje rezistentnih populacija i njihovih gena za rezistenciju (Gaze i Depledge, 2017; Gonzalez-Plaza i sur., 2018; Qiao i sur., 2018.). Različita istraživanja navode da geni za antibiotsku rezistenciju koji cirkuliraju među patogenima potječu iz okolišnih bakterija, ukazujući na važnu ulogu okoliša u širenju rezistentnih patogena (Nordmann i sur., 2008; Wellington i sur., 2013). Ljudi mogu doći u kontakt s rezistentnim bakterijama u okolišu na različite načine uključujući konzumaciju onečišćene pitke vode ili hrane te kupanjem u onečišćenoj rijeci/jezeru. Zato je u borbi protiv rezistentnih patogena, pored bolničkih sredina, važno rezistenciju pratiti i u okolišu kako bi se identificirali ključni izvori i provele mjere kontrole daljnjeg širenja rezistentnih sojeva.

2.2.2.3. Uloga farmaceutske industrije

Kao jedan od važnih faktora u širenju antibiotske rezistencije u okolišu su otpadne vode porijeklom iz farmaceutske industrije. Takve otpadne vode mogu sadržavati smjese antibiotika u visokim koncentracijama, ali i druga zagađivala koja potiču selekciju rezistencije na antibiotike poput teških metala (Bielen i sur., 2017; Gonzalez-Plaza i sur., 2019). Prema tome, ispušt ovakvih otpadnih voda može s jedne strane ugroziti zdravlje okoliša toksičnim djelovanjem antibiotika i drugih zagađivala na okolišne organizme (Dyer i sur., 2003; Spänhoff i sur., 2007), ali s druge strane i zdravlja ljudi poticanjem razvoja i širenja rezistentnih bakterijskih populacija (Zhang i sur., 2018).

Problem farmaceutskih otpadnih voda visoko zagađenih antibioticima se naročito ističe u Indiji gdje su u otpadnim vodama iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda na koji dolaze otpadne vode iz 90-tak farmaceutskih industrija zabilježene koncentracije ciprofloksacina, antibiotika iz skupine fluorokinolona, od 31 mg/L (Larsson i sur., 2007; Larsson, 2014).

Posljedično, ispušt ovakvih otpadnih voda doveo je do onečišćenja riječnog sedimenta te površinskih, podzemnih i pitkih voda (Fick i sur., 2009), ali također i do obogaćenja rezistentnih determinanti (bakterija, gena i pokretnih genetičkih elemenata poput plazmida) u izloženom

okolišu (Bengtsson-Palme i sur., 2014; Kristiansson i sur., 2011; Marathe i sur., 2013). Slična situacija zabilježena je i u Kini, gdje su u otpadnim vodama iz proizvodnje tetraciklina i β -laktama detektirane visoke koncentracije oksitetraciklina (19,5 mg/L) (Li i sur., 2009) odnosno penicilina (44 mg/L) (Li i sur., 2010).

Što se tiče situacije u Hrvatskoj, Bielen i sur. (2017) pokazali su da otpadne vode iz proizvodnje azitromicina mogu sadržavati vrlo visoke koncentracije makrolidnih antibiotika, azitromicina kao konačnog produkta proizvodnje (do 3,8 mg/L) i eritromicina kao ishodišne tvari u sintezi (do 2 mg/L). Ispusti ovako nedovoljno obrađenih otpadnih voda u rijeku Savu su stoga doveli do zagađenja površinske riječne vode i sedimenta na mjestu ispusta i nizvodno od ispusta, čak 11 km nizvodno. Bitno je spomenuti da su koncentracije azitromicina u sedimentu na mjestu ispusta dosezale vrlo visoke razine, čak do 23 mg/kg sedimenta (Milaković i sur., 2019). Zbog svega navedenog, nužno je konstantno praćenje i kontrola ispusta otpadnih voda iz farmaceutske industrije kako bi se smanjio unos antibiotika u okoliš, a samim time i ograničio razvoj i širenje rezistencije bakterija na antibiotike.

3. HIPOTEZE

Hipoteze ovog istraživanja su:

- Sediment rijeke Save zagađen makrolidnim antibioticima predstavlja spremnik bakterija rezistentnih na makrolide;
- Bakterije porijeklom iz zagađenog sedimenta posjeduju mehanizme rezistencije slične onima koji prevladavaju među bakterijama u bolničkim sredinama;
- Okoliš zagađen antibioticima može biti žarište za daljnje širenje gena za antibiotsku rezistenciju unutar i izvan okoliša.

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Budući da porast rezistencije na antibiotike unutar okoliša izloženog ispustu otpadnih voda iz farmaceutske industrije predstavlja opasnost od daljnjeg širenja gena za rezistenciju izvan okoliša, glavni cilj ovog rada je usporediti mehanizme rezistencije na makrolidne antibiotike između skupine izolata porijeklom iz okoliša zagađenog makrolidima i skupine kliničkih izolata prikupljenih pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević".

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- Izolirati bakterije rezistentne na makrolide iz sedimenta rijeke Save na mjestu ispusta otpadnih voda iz proizvodnje azitromicina i uzvodno od ispusta (kontrolna lokacija);
- Identificirati izolirane okolišne bakterije i kliničke izolate uključene u istraživanje te potvrditi rezistenciju fenotipskim metodama;
- Identificirati mehanizme za makrolidnu rezistenciju u okolišnih i bolničkih izolata;
- Utvrditi postoji li sličnost sekvenci dominantnog gena za makrolidnu rezistenciju između okolišnih i kliničkih izolata.

5. MATERIJALI

5.1. Priprema hranjivih podloga i otopina

5.1.1. R2A (*Reasoner's 2A agar*) čvrsta podloga s ekstraktom kvasca

R2A čvrsta hranjiva podloga (Lab M Limited, Engleska) pripremljena je otapanjem 3 g podloge u 1 L destilirane vode. Sterilizacija je izvršena u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Podloga je imala pH vrijednost $7,2 \pm 0,2$. Nakon sterilizacije i hlađenja podloge na približno 50 °C, u sterilnim uvjetima dodan je ekstrakt kvasca (5 g/L; Biolife, Italija) i antimikotik cikloheksimid (100 mg/L; Sigma Aldrich, Njemačka) te antibiotik azitromicin (15 mg/L; Fluka, Njemačka). Za izolaciju bakterija rezistentnih na antibiotik azitromicin, primijenjena je ista podloga uz dodatak azitromicina (15 mg/L; Fluka, Njemačka).

5.1.2. Mueller-Hintonova čvrsta podloga s dodatkom selektivnog *Staph/Strepp* suplementa

Mueller-Hintonova čvrsta hranjiva podloga (Merck, Njemačka) pripremljena je otapanjem 38 g podloge u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C i ima pH $7,4 \pm 0,2$. Nakon sterilizacije i hlađenja, podlozi je u sterilnim uvjetima dodan cikloheksimid (100 mg/L) i *Staph/Strepp* suplement (5 ml/L; Mast group, Engleska) za selektivni rast stafilokoka i streptokoka. Za izolaciju bakterija rezistentnih na azitromicin, primijenjena je ista podloga uz dodatak azitromicina (15 mg/L).

5.1.3. Mueller-Hintonov bujon

Mueller-Hintonov bujon (Merck, Njemačka) pripremljen je otapanjem 21 g podloge u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C. Cikloheksamid (100 mg/L) je dodan nakon autoklaviranja i hlađenja podloge na 50 °C. Za izolaciju bakterija rezistentnih na azitromicin, podlozi je još dodan antibiotik azitromicin (15 mg/L).

5.1.4. Columbia čvrsta hranjiva podloga s dodatkom *Staph/Strepp* suplementa i konjske krvi

Columbia čvrsta hranjiva podloga (Mast Group, Engleska) pripremljena je otapanjem 39 g podloge u 1 L destilirane vode. Sterilizacija je izvršena na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja na 50 °C, podlozi je u sterilnim uvjetima dodan *Staph/Strepp* suplement (5ml/L), defibrinirana konjska krv (5%; Biognost, Hrvatska) i cikloheksimid (100 mg/L). Za izolaciju bakterija rezistentnih na azitromicin, podlozi je još dodan azitromicin (8 mg/L).

5.1.5. Columbia čvrsta hranjiva podloga s dodatkom konjske krvi

Columbia čvrsta hranjiva podloga (Mast Group, Engleska) pripremljena je otapanjem 39 g podloge u 1 L destilirane vode. Nakon sterilizacije podloge (121 °C, 15 minuta) i hlađenja na

50 °C, u podlogu je u sterilnim uvjetima dodano još 5% defibrinirane konjske krvi. Za izolaciju bakterija rezistentnih na azitromicin, podlozi je još dodano i 2 mg/L azitromicina.

5.1.6. Priprema 1%-tnog agaroznog gela

1%-tni agarozni gel pripremljen je polaganim zagrijavanjem agaroze (1 g; Sigma, Njemačka) do tališta u 1 x TAE puferu (100 mL). Nakon hlađenja rastaljene agaroze na 50-60 °C, a prije izlijevanja gela u kadicu za elektroforezu, u gel je dodan etidijev bromid (0,5 µg/mL) za detekciju umnoženih fragmenata DNA.

5.2. Priprema korištenih otopina

5.2.1. Priprema fiziološke otopine

Fiziološka otopina (0,9%) pripremljena je otapanjem 9 g natrijevog klorida u 1 L destilirane vode. Sterilizacija je izvršena u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 minuta.

5.2.2. Priprema 0,5 McFarland standarda

U staklenu posudu od 100 mL dodano je 0,05 mL 1%-tnog barijeva klorida dihidrata i 9,95 mL 1%-tne sumporne kiseline, te nadopunjeno destiliranom vodom do 100 mL.

5.2.3. Priprema 1 x tris-acetatnog EDTA pufera (TAE)

U 900 mL destilirane vode dodano je 100 mL 10 x TAE komercijalnog pufera (Invitrogen, SAD).

6. METODE

6.1. Uzorkovanje riječnog sedimenta

Uzorkovanje sedimenta iz rijeke Save provedeno je na dvije lokacije: 1) na lokaciji ispusta otpadnih voda iz farmaceutske industrije Pliva u blizini grada Zaprešića i 2) na kontrolnoj lokaciji smještenoj približno 7,5 km uzvodno od ispusta u Samoborskom Otoku. Uzorci površinskog sedimenta (5-10 cm) sakupljeni su pomoću plastičnih korera s četiri mjesta na svakoj lokaciji (međusobno udaljene otprilike 2 m) kako bi se dobio reprezentativni uzorak. Na svakoj lokaciji sakupljeno je približno 2 kg mokrog sedimenta (500 g/poduzorku) i pohranjeno u sterilne plastične vrećice. Prikupljeni uzorci su na ledu transportirani do laboratorija te upotrijebljeni za pripremu kompozitnog uzorka sedimenta za svaku lokaciju (mješavina 50 g sedimenta svakog poduzorka). Kompozitni uzorci su isti dan upotrijebljeni za mikrobiološke analize.

6.2. Izolacija bakterija rezistentnih na azitromicin iz sedimenta

Za izolaciju bakterija iz sedimenta, 1 g uzorka dodan je u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine (razrjeđenje 10^{-1}), te je smjesa vorteksirana 1 minutu na laboratorijskoj miješalici da se dobije jednolična suspenzija. Potom je napravljena serija decimalnih razrjeđenja u rasponu od 10^{-1} do 10^{-5} i po 100 μ L suspenzije svakog razrjeđenja naciepljeno je u tri replike na čvrste hranjive podloge sa i bez dodatka azitromicina. Hranjive podloge bez dodatka antibiotika korištene su za izolaciju ukupnih bakterija iz sedimenta, dok je za izolaciju bakterija rezistentnih na azitromicin, u podloge dodan azitromicin u konačnoj koncentraciji od 15 mg/L.

Naciepljene hranjive podloge R2A i Mueller Hinton s dodatkom *Staph/Strep* suplementa inkubirane su 5-7 dana pri temperaturi od 28 °C, dok je Columbia agar inkubiran pri 35 °C 2 dana, nakon čega su izbrojane ukupne i rezistentne bakterije porasle na odgovarajućim podlogama. Makromorfološki različite kolonije porasle na podlogama sa azitromicinom odabrane su za daljnju izolaciju. Izolacija pojedinačnih kolonija provedena je višestrukim precjepljivanjem odabranih kolonija na iste čvrste hranjive podloge sa azitromicinom. Od pročišćenih kolonija, jedna je kolonija karakteristične makromorfologije naciepljena u Mueller-Hintonov bujon s dodatkom azitromicina u odgovarajućoj koncentraciji (8 mg/L ili 15 mg/L) te inkubirana preko noći pri 37 °C. Po 900 μ L svake prekonocne kulture pomiješano je s 50%-tnim glicerolom (900 μ L), izmiješano na miješalici i pohranjeno na -80 °C.

6.3. Klinički bakterijski izolati uključeni u istraživanje

Istraživanje je provedeno na ukupno 90 bakterijskih izolata, većinom streptokoka, prikupljenih tijekom 2014. do 2018. godine u Referentnom centru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravstva pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Svi izolati su zadovoljavali kriterij smanjene osjetljivosti na makrolidne antibiotike, utvrđene disk difuzijom prema smjernicama EUCAST-a (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Identifikacija bakterijskog roda svakog izolata provedena je

standardnim biokemijskim testovima. Izolati su dostavljeni u Laboratorij za okolišnu mikrobiologiju i biotehnologiju Instituta Ruđer Bošković, gdje je ponovnim testiranjem potvrđen fenotip rezistencije na makrolide (određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije za makrolide) i provedena identifikacija bakterijske vrste sekvenciranjem 16S rRNA gena.

6.4. Izolacija ukupne bakterijske DNA

Izolacija ukupne bakterijske DNA svih okolišnih i kliničkih izolata provedena je primjenom enzimskog tretmana i toplo-hladnog šoka. Postupak je bio sljedeći: mikrobiološkom ezom uzeta je jedna kolonija s hranjive podloge i resuspendirana u 150 μ L 5 mM Tris HCl pufera (pH = 8,5). Potom je dodan 1 μ L lizozima (100 μ g/mL) i suspenzija je izmiješana vorteksiranjem, te inkubirana 1 sat pri 37 °C. Nakon inkubacije dodano je 6,5 μ L proteinaze K (1 mg/L; Promega, SAD) i slijedila je inkubacija 2 sata pri 55 °C. Nakon toga uslijedila je inaktivacija enzima grijanjem uzoraka 10 minuta u vodi zagrijanoj na 100 °C, pa hlađenjem u ledu tijekom 3 minute. Posljednja dva koraka ponovljena su još dva puta nakon čega su mikroeprovete centrifugirane (13 000 g, 10 minuta), a supernatant koji sadrži bakterijsku DNA prebačen u nove mikroeprovete i pohranjen na -20 °C.

6.5. Identifikacija okolišnih i kliničkih izolata

Za identifikaciju izolata do razine vrste korištene su metode lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i sekvenciranja 16S rRNA gena. Za umnažanje 16S rRNA gena PCR metodom korištene su univerzalne početnice: 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') i 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Lane, 1991), koje umnažaju segment 16S rRNA gena veličine 1,476 kb. Ukupan volumen PCR reakcijske smjese bio je 37,5 μ L, a sastav smjese naveden je u Tablici 2. Umnažanje 16S rRNA gena provedeno je kroz 35 ciklusa pod uvjetima prikazanim u Tablici 3. Kao pozitivna kontrola korištena je DNA bakterije *Streptococcus pyogenes*, a kao negativna kontrola korištena je voda bez RNA/DNA umjesto bakterijske DNA.

Tablica 2. Komponente PCR reakcije za umnažanje 16S rRNA gena.

Komponenta	Početni volumen (μ L)	Konačna koncentracija
EmeraldAmpMax PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	22,5	-
Uzvodna početnica 27F	0,75	10 mM
Nizvodna početnica 1492R	0,75	10 mM
H ₂ O	12,0	-
DNA kalup	1,5	-

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje 16S rRNA gena.

Faza	Temperatura (°C)	Trajanje
Početna denaturacija	98	5 min
Denaturacija	98	10 s
Sparivanje početnica	55	30 s
Sinteza komplementarnih lanaca	72	1 min i 30 s
Završna elongacija	72	5 min

Dobiveni PCR produkti razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. U prvu i zadnju jažicu gela nanoseno je 3,5 µL DNA markera (10 kb; Takara Biotechnology, Kina), a u ostale jažice po 2,5 µL PCR produkta. Elektroforeza je trajala 30 minuta pri naponu od 90 V, nakon čega su PCR produkti vizualizirani pod UV svjetlom na transiluminatoru. Ostatak PCR produkta (35 µL) poslan je na sekvenciranje u komercijalni servis (Macrogen, Amsterdam, Nizozemska). Dobivene sekvence uređene su u programu Chromas Lite v2.1. (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) i uspoređene s onima u NCBI GeneBank (engl. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka putem BLAST servisa (Altschul i sur. 1990), kako bi se pronašle najbližije sekvence.

6.6. Detekcija i karakterizacija gena za rezistenciju na makrolidne antibiotike

6.6.1. Detekcija odabranih gena PCR metodom

Kod svih okolišnih i kliničkih izolata napravljena je PCR analiza na ukupno 11 gena za rezistenciju na makrolide koji kodiraju metiltransferaze (*ermA*, *ermB*, *ermC* i *ermF*), fosfotransferaze (*mphE*), makrolidne efluks pumpe (*mefA* i *mefC*), proteine za zaštitu ribosoma (*msrA*, *msrE* i *msrD*) i GTP-aza vezujuće proteine (*hflX*). Volumen reakcijske smjese iznosio je 12,5 µL, a sastav smjese naveden je u Tablici 4. Početnice korištene za umnažanje odabranih gena prikazane su u Tablici 5. Uvjeti PCR reakcija bili su sljedeći: 1) početna denaturacija kalupa DNA u trajanju od 10 sekundi pri 94 °C, 2) faza umnažanja PCR produkta koja se sastojala od tri segmenta: a) denaturacije DNA kalupa pri 98 °C u trajanju od 10 sekundi, sparivanja početnica i denaturiranog DNA kalupa u vremenu od 30 sekundi pri temperaturi specifičnoj za svaki par početnica i navedenoj u Tablici 5. i c) elongacijskog segmenta na 72 °C pri kojem se sintetizirao komplementarni lanac DNA i čije je trajanje definirano veličinom PCR produkta (Tablica 5.), nakon čega je uslijedila 3) faza završne elongacije na 72 °C u trajanju od 7 minuta. Za svaku PCR reakciju napravljena je pozitivna kontrola koja je uključivala DNA iz bakterije pozitivne na određeni gen i negativna kontrola s vodom umjesto DNA.

Tablica 4. Sastav PCR reakcijske smjese za umnažanje odabranih gena.

Komponenta	Početni volumen (μL)	Konačna koncentracija
EmeraldAmpMax PCR Master Mix (Takara Biotechnology, Kina)	7,5	-
Uzvodna početnica	0,25	10 mM
Nizvodna početnica	0,25	10 mM
H ₂ O	4,0	-
DNA kalup	0,5	-

Tablica 5. Sekvence početnica i uvjeti PCR reakcije za umnažanje gena odgovornih za makrolidnu rezistenciju.

Gen	Dužina gena (pb)	Sekvenca početnice (5'-3')	T _a (°C)*	Vrijeme sinteze lanaca	Broj ciklusa	Referenca
<i>ermA</i>	645	F*: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R*: CTTGATAGTTTATTAATATTAG	53	1 min	35	Mišić i sur., 2017
<i>ermB</i>	639	F: GAAAAGGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	51	1 min	30	Gygax i sur., 2006
<i>ermC</i>	642	F: TCAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	51	45 sec	35	Mišić i sur., 2017
<i>ermF</i>	466	F: CGGGTCAGCACTTTACTATTG R: GGACCTACCTCATAGACAAG	59	45 sec	35	Roberts i sur., 1999
<i>mefA</i>	1759	F: GCGTTTAAGATAAGCTGGCA R: CCTGCACCATTGCTCCTAC	55	2 min	35	Grivea i sur., 2012
<i>mefC</i>	1156	F: GGCTGGACAGTTTGCTTC R: CATTAAAGTTGCGAGTGCTAAAC	52	2 min	30	Gonzalez Plaza i sur., 2018
<i>msrA</i>	940	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCC TGTT	56	1 min	35	Mišić i sur., 2017
<i>msrE</i>	1352	F: GCGAGAAACATACGCTTG R: GGTCAGATAGTTTCCTGGTTC	53	2 min	30	Gonzalez Plaza i sur., 2018
<i>msrD</i>	1202	F: TGCCTATATCCCAGTTG R: GTAATCGTTTATCGTGGGTG	57	1 min i 30 s	35	Amezaga i sur., 2002
<i>mphE</i>	855	F: CACTTGCTGAAGCACACG R: CTCCCAACTGAGCTTTTGC	53	1 min	30	Gonzalez Plaza i sur., 2018
<i>hflX</i>	1191	F: CTGAAGACCGAAGAGCCATC R: CTTGACCAGTGACCTTCTCC	58	2 min	30	Gonzalez Plaza i sur., 2018

*T_a- temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA (engl. *annealing temperature*)

*F - uzvodna početnica; R – nizvodna početnica

Dobiveni PCR produkti razdvojeni su horizontalnom gel elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u trajanju od 30 minuta pri 90 V. Za provjeru veličine fragmenta dobivenog amplikona korišten je DNA marker 1 kb (Promega, SAD). Dobiveni PCR produkti vizualizirani su na UV transiluminatoru.

6.6.2. Sekvenciranje odabranih gena

Od 11 analiziranih gena za rezistenciju na makrolide, četiri gena (*ermB*, *mefA*, *msrD* i *mphE*) su odabrana za analizu sekvenciranjem nakon što im je prisutnost u okolišnim i kliničkim izolatima potvrđena PCR-om. Za potrebe sekvenciranja, geni su prvo umnoženi PCR metodom u većem volumenu (37,5 µL), nakon čega je prisutnost PCR produkta provjerena gel elektroforezom i vizualizacijom gela, kao što je opisano u poglavlju 6.6.1. PCR reakcije provedene su prema uvjetima i postavkama prikazanim u Tablici 5. PCR produkt (35 µL) poslan je na sekvenciranje u Macrogen servis (Nizozemska).

Dobivene sekvence uređene su pomoću programa Chromas Lite v2.1. (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) i uspoređene s onima u NCBI bazi podataka putem BLAST servisa. Uređene sekvence, zajedno s odabranim sekvencama iz baze podataka, dalje su obrađene u programu ClustalX v2.1. (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Za izradu filogenetskog stabla korišten je program Mega-X (Tamura i sur., 2013), a za vizualizaciju stabla program ITOL (engl. *Interactive Tree of Life*) (<https://itol.embl.de/>).

6.7. Testiranje osjetljivosti izolata na antibiotike

Osjetljivost izolata na antibiotike testirana je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za antibiotike iz skupina makrolida (eritromicin, azitromicin i klaritromicin), tetraciklina (tetraciklin), β-laktama (ampicilin) i fluorokinolona (ciprofloksacin). Određivanje MIK vrijednosti provedeno je metodom mikrodilucije, koja je uključivala dvostruka razrjeđenja antibiotika u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Prvi korak uključivao je naciepljivanje izolata na čvrste hranjive podloge s dodatkom azitromicina (15 mg/L) i inkubaciju pri 37 °C/24 sata. Pojedinačna kolonija precijepljena je u tekuću Mueller-Hinton podlogu sa azitromicinom (15 mg/L) za prekonoćnu inkubaciju pri 37 °C uz vrtnju (150 rpm). Dobivena kultura razrijeđena je u tekućoj Mueller-Hinton podlozi do optičke gustoće koja je odgovarala standardu 0,5 McFarlanda (1 McFarland standard ≈ 10⁸ CFU/mL). U svaku jažicu naciepljeno je 100 µL ovako pripremljenog inokuluma. Za testiranje osjetljivosti na makrolide, tetracikline i β-laktame korištene su koncentracije antibiotika u rasponu od 2 mg/L do 128 mg/L, dok su za ciprofloksacin koncentracije bile u rasponu od 0,25 mg/L do 16 mg/L. Mikrotitarske pločice su inkubirane 18 sati pri 28 °C, nakon čega je očitana vrijednost MIK-a, a to je koncentracija koja se nalazila u prvoj jažici (u koncentracijskom nizu) u kojoj nema rasta bakterija (zamućenja). Dobivene MIK vrijednosti interpretirane su prema CLSI-ovim (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) smjernicama za okolišne izolate (priručnik M45 *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or*

Fastidious Bacteria) (2016) i za kliničke izolate (priručnik M100-S24 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*) (2014).

7. REZULTATI

7.1. Identifikacija okolišnih i kliničkih izolata sekvenciranjem 16S rRNA gena

U ovom istraživanju izolirano je ukupno 228 azitromicin-rezistentnih izolata iz sedimenta rijeke Save (okolišni izolati), od kojih je 104 izolata bilo s kontrolne (uzvodne) lokacije, a 124 izolata s lokacije ispusta industrijskih otpadnih voda. Nakon izolacije na prikladnim selektivnim podlogama, izračunat je udio bakterija rezistentnih na azitromicin u sedimentu rijeke Save na mjestu ispusta i uzvodno od ispusta industrijskih otpadnih voda (Tablica 6). Iz prikazanih rezultata vidljiv je izrazito visoki udio rezistentnih bakterija (34% odnosno 55%) na lokaciji ispusta u odnosu na uzvodnu lokaciju (oko 3%). Većina okolišnih izolata pripadala je skupini Gram-pozitivnih bakterija i to 103 izolata (99%) na uzvodnoj lokaciji i 90 izolata (72,6%) na lokaciji ispusta. Sekvenciranjem 16S rRNA gena okolišni izolati identificirani su do razine roda/vrste te je njihovim grupiranjem u taksonomske jedinice uočena razlika na razini koljena i roda između lokacije ispusta i uzvodne lokacije (Tablica 7., Slika 6.). Iz Tablice 7. vidljivo je da je na lokaciji ispusta došlo do značajnog porasta zastupljenosti bakterijskog koljena *Proteobacteria* i značajnog smanjenja udjela koljena *Firmicutes* u odnosu na uzvodnu lokaciju. Nasuprot tome, bakterijsko koljeno *Actinobacteria* podjednako je zastupljeno ($\approx 50\%$) i dominantno na obje lokacije.

Tablica 6. Udio rezistentnih bakterija u sedimentu rijeke Save na dvije istraživane lokacije.

Hranjiva podloga	Lokacija	
	Uzvodno	Ispust
R2A+Y+AZI15	3,1%	34,0%
MH+SS+AZI15	2,5%	55,4%

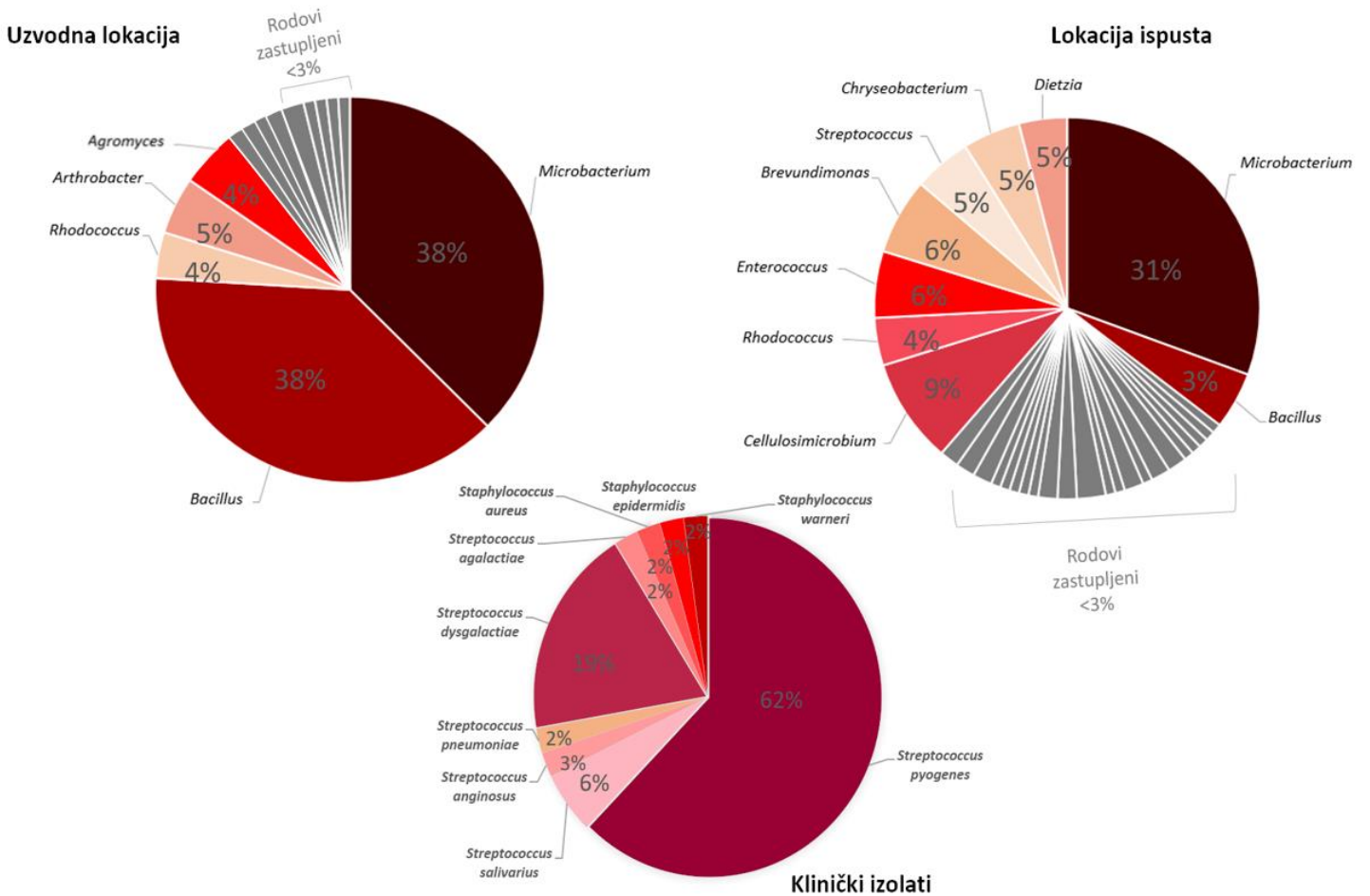
*R2A+Y+AZI15 – R2A čvrsta hranjiva podloga s ekstraktom kvasca i dodatkom azitromicina (15mg/L);

*MH+SS+AZI15 – Mueller-Hinton čvrsta hranjiva podloga sa *Staph/Strepp* selektivnim suplementom i dodatkom azitromicina (15mg/L).

Tablica 7. Zastupljenost bakterijskih koljena u sedimentu rijeke Save na istraživanim lokacijama.

Koljeno	<i>Actinobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>		
				α - <i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>
Uzvodna lokacija	56,7%	42,3%	0%	0%	0%	1,0%
Lokacija ispusta	52,4%	20,2%	5,7%	8,1%	5,7%	8,1%

Iz taksonomske podjele okolišnih izolata na razini roda, prikazane na Slici 6., može se uočiti da je na lokaciji ispusta identificirano više različitih rodova (n=31) u odnosu na uzvodnu lokaciju (n=11). Na obje lokacije dominantan rod je *Microbacterium* (*Actinobacteria*). Na uzvodnoj lokaciji podjednako (38%) je zastupljen i rod *Bacillus* (*Firmicutes*), dok se na lokaciji ispusta rod *Cellulosimicrobium* (*Actinobacteria*) ističe kao dominantan.



Slika 6. Raznolikost rodova okolišnih i kliničkih izolata.

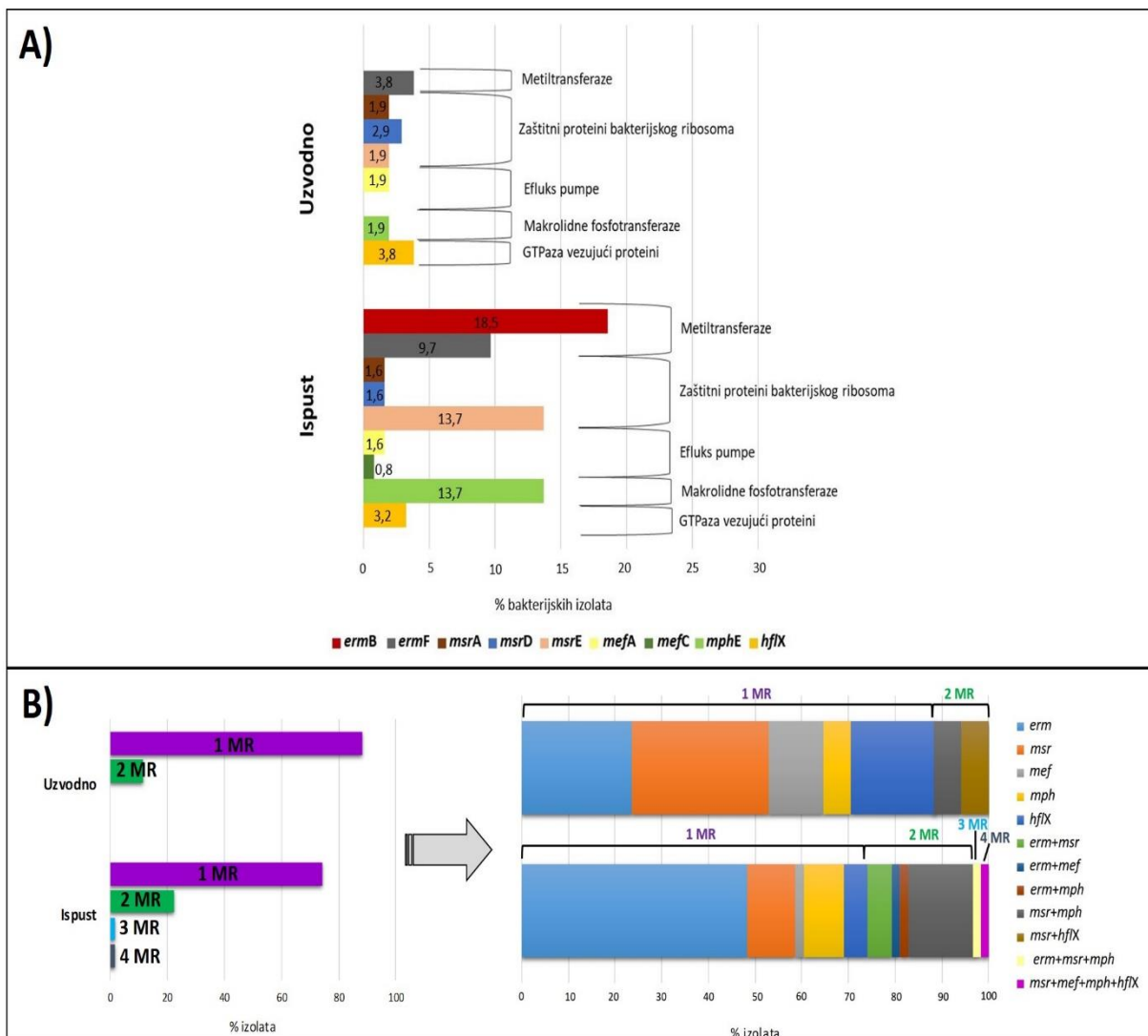
U skupini kliničkih izolata uključenih u ovu studiju (90 izolata), sekvenciranjem 16S rRNA gena utvrđeno je da većina tih izolata (84 izolata, 93,3%) pripada rodu *Streptococcus*, a manji udio (6 izolata, 6,7%) rodu *Staphylococcus* (Slika 6.). Najbrojniji klinički izolati unutar roda *Streptococcus* su vrste *Streptococcus pyogenes* (62,2%), *Streptococcus dysgalactiae* (18,9%) i *Streptococcus salivarius* (5,6%), dok su u manjem postotku (oko 2%) izolirane vrste *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus agalactiae*. Iz roda *Staphylococcus* izolirane su vrste *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus warneri*, sve u istom postotku od 2,2%.

7.2. Identifikacija mehanizama makrolidne rezistencije detekcijom gena

7.2.1. Okolišni izolati

Prisutnost gena za makrolidnu rezistenciju potvrđena je PCR metodom u 17 izolata (16,3%) sa uzvodne lokacije te u 58 izolata (46,8%) s lokacije ispusta. Iz Slike 7.A. vidljivo je da je u izolatima sa uzvodne lokacije detektirano 7 od 11 ispitivanih gena koji predstavljaju 5 različitih mehanizama rezistencije na makrolide posredovanih metiltransferazama (gen *ermF*), zaštitnim proteinima bakterijskog ribosoma (geni *msrA*, *msrD* i *msrE*), efluks pumpama (*mefA*), fosfotransferazama (*mphE*) i GTP-aza vezujućim proteinima (gen *hflX*). Pritom je u najvećem broju izolata sa uzvodne lokacije (n=7; 6,7%) detektiran mehanizam rezistencije posredovan zaštitnim proteinima ribosoma koji je kodiran genima *msrA*, *msrD* i *msrE*, a mehanizmi koje kodiraju geni *ermF* i *hflX* pronađeni su u 4 izolata (3,8%). U niti jednom izolatu na uzvodnoj lokaciji nisu pronađeni geni *ermA*, *ermB*, *ermC* i *mefC*.

Iz Slike 7.A. također se može uočiti da je u izolatima s lokacije ispusta detektirano 9 od ukupno 11 ispitivanih gena i da je među tim izolatima u usporedbi s kontrolnim izolatima došlo do značajnog porasta zastupljenosti tri mehanizma makrolidne rezistencije. Oni uključuju mehanizam posredovan metiltransferazama (geni *ermB* i *ermF*) koji je porastao s 4% na 28%, mehanizam posredovan zaštitnim proteinima ribosoma (najveći porast udjela gena *msrE*) koji je porastao sa 7% na 17% te mehanizam posredovan fosfotransferazama (gen *mphE*) koji bilježi porast s 2% na 13%. Ostala dva mehanizma posredovana efluks pumpama (prvenstveno gen *mefA*) i GTP-aza vezujućim proteinima (gen *hflX*) bila su podjednako zastupljena među izolatima porijeklom s obje lokacije (u 2% do 4% izolata).

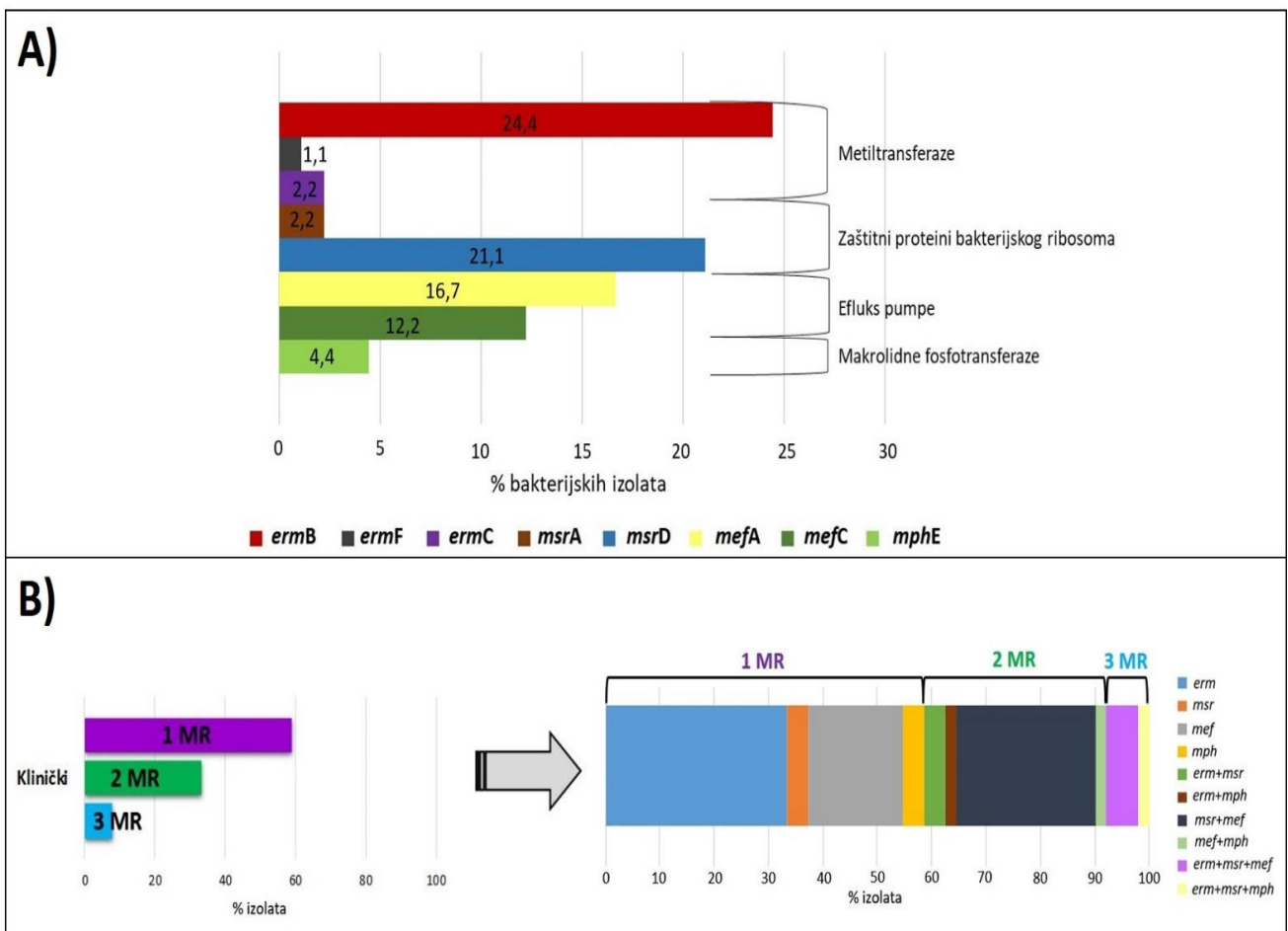


Slika 7. Raspodjela pojedinačnih (A) i višestrukih (B) mehanizama rezistencije u okolišnih izolata sa uzvodne lokacije i lokacije ispusta industrijskih otpadnih voda.

Daljnja analiza različitih mehanizama rezistencije u okolišnih izolata, prikazana na Slici 7.B., pokazala je da je većina izolata sa uzvodne lokacije (88,1%) i lokacije ispusta (72,4%) imala jedan mehanizam za makrolidnu rezistenciju (1 gen za rezistenciju). Dva različita mehanizma rezistencije detektirana su u 11,8% izolata sa uzvodne lokacije i u dvostruko više izolata (24,1%) s lokacije ispusta. Kod izolata sa uzvodne lokacije, dvostruki mehanizmi su uključivali kombinacije gena *msr* grupe i gena *mphE* (5,9%) ili *hflX* (5,9%). Nadalje, iz Slike 7.B. može se uočiti da je pojava tri ili više različitih mehanizama rezistencije detektirana samo u izolatima s lokacije ispusta. Pritom su u 1,7% izolata detektirana istovremeno tri različita mehanizma rezistencije posredovana kombinacijom gena iz *erm* grupe, *msr* grupe i gena *mphE*, a u 1,7% izolata detektirana je kombinacija od čak četiri različita mehanizma rezistencije posredovana kombinacijom gena *msr-mef-mpHE-hflX*.

7.2.2. Klinički izolati

Od ukupno 90 istraživanih kliničkih izolata, geni za makrolidnu rezistenciju detektirani su u 51 izolatu (56,7%). Iz raspodjele mehanizama makrolidne rezistencije među tim pozitivnim izolatima (Slika 8.A) vidljivo je da je utvrđena prisutnost četiri različita mehanizma, pri čemu su najzastupljeniji mehanizmi posredovani efluks pumpama (28,9%), metiltransferazama (27,7%) i zaštitnim ribosomskim proteinima (23,3%). Iz Slike 8.A. nadalje proizlazi da su u mehanizam posredovan efluks pumpama uključeni geni *mefA* i *mefC* koji su detektirani u 16,7% odnosno 12,2% izolata. Metilacija ribosoma putem metiltransferaza posredovana je prvenstveno genom *ermB* koji je detektiran u 24,4% izolata te u manjoj mjeri genima *ermC* i *ermF*, detektiranim u ukupno 3,3% izolata. Mehanizam koji uključuje zaštitne ribosomske proteine kodiran je uglavnom genom *msrD* koji je detektiran u 21,1% izolata te u manjoj mjeri genom *msrA* (2,2% izolata). Mehanizam posredovan fosfotransferazama kojeg kodira gen *mphE* detektiran je u najmanjem broju kliničkih izolata (4,4%). Za razliku od okolišnih izolata, u kliničkim izolatima detektiran je mehanizam rezistencije posredovan genom *ermC*, dok mehanizmi posredovani genima *msrE* i *hflX* nisu pronađeni niti u jednom kliničkom izolatu.



Slika 8. Raspodjela pojedinačnih (A) i višestrukih (B) mehanizama rezistencije u kliničkih izolata.

Iz daljnje analize raspodjele mehanizama rezistencije u kliničkih izolata, prikazane na Slici 8.B., proizlazi da je najveći postotak kliničkih izolata (58,5%) imao jedan mehanizam rezistencije posredovan genom iz *erm*, *msr*, *mef* ili *mph* grupe. Manji broj izolata (35,3%) imao je po dva različita mehanizma makrolidne rezistencije, koji su uključivali kombinacije gena *erm-msr*, *erm-mphE*, *msr-mef* i *mef-mphE*, pri čemu je najzastupljenija dvostruka kombinacija gena *msrD-mefA*. Tri različita mehanizma rezistencije posredovana kombinacijom gena *erm-msr-mef* potvrđena su u 5,9% kliničkih izolata. Četiri mehanizma rezistencije nisu pronađena ni kod jednog kliničkog izolata.

7.3. Fenotipske i genotipske karakteristike izolata rezistentnih na azitromicin

7.3.1. Okolišni izolati

Okolišni izolati u kojima je PCR-om potvrđena prisutnost gena za makrolidnu rezistenciju su testirani određivanjem MIK-a na osjetljivost na ukupno 6 antibiotika razvrstanih u 4 skupine: makrolidi (eritromicin, azitromicin i klaritromicin), tetraciklini (tetraciklin), β -laktami (ampicilin) i fluorokinoloni (ciprofloksacin).

Iz Tablice 8. vidljivo je da je većina analiziranih izolata sa uzvodne lokacije pripadala rodovima *Bacillus* i *Microbacterium*, koji su posjedovali uglavnom pojedinačne i različite gene za rezistenciju na makrolide. Gen *hflX* koji je dominirao među izolatima sa uzvodne lokacije, pronađen je samo u rodu *Bacillus*, dok je jednako zastupljen gen *ermF* bio pronađen u izolatima roda *Bacillus*, *Microbacterium* i *Arthrobacter*. Svi izolati iz ovih rodova ispoljavali su rezistenciju na sva tri makrolidna antibiotika, pri čemu je izolat *Microbacterium* sp. 768, koji je imao gen *mefA*, bio dodatno rezistentan i na tetraciklin, a izolat *Microbacterium* sp. HCD08 bio je umjereno rezistentan na ciprofloksacin. U dva izolata, *Acinetobacter johnsonii* i *Bacillus licheniformis*, potvrđena je prisutnost dva rezistentna gena, *msrE-mphE* odnosno *msrA-hflX*, koji kodiraju različite mehanizme makrolidne rezistencije.

Tablica 8. Raspodjela detektiranih gena za rezistenciju na makrolide i profil rezistencije u skupini izolata sa uzvodne lokacije.

Koljeno	Rod ili vrsta izolata	Broj izolata	Gen za makrolidnu rezistenciju	MIK (mg/L)					
				ERI	AZI	KLA	TET	AMP	CIPRO
Actinobacteria	<i>Microbacterium</i> sp.	1	<i>msrD</i>	>128	>128	>128	<2	4	1
		1	<i>mefA</i>	>128	>128	>128	16	32	<0.25
		1	<i>mphE</i>	>128	>128	>128	<2	64	2
		1	<i>msrD</i>	>128	>128	4	<2	<2	16
	1	<i>ermF</i>	>128	>128	64	<2	<2	4	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	1	<i>ermF</i>	>128	>128	8	<2	<2	<0.25
Firmicutes	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	<i>msrA+hflX</i>	>128	>128	128	<2	>128	<0.25
		1	<i>ermF</i>	>128	>128	128	<2	>128	<0.25
		1	<i>msrE</i>	>128	>128	128	<2	>128	<0.25
		1	<i>msrD</i>	>128	>128	128	<2	128	<0.25
		1	<i>ermF</i>	>128	>128	128	<2	64	<0.25
		1	<i>hflX</i>	>128	>128	128	<2	16	<0.25
		1	<i>hflX</i>	>128	>128	128	<2	>128	<0.25
		1	<i>hflX</i>	>128	>128	128	4	>128	<0.25
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.	1	<i>msrE+mphE</i>	128	128	64	<2	4	<0.25

*ND – nije određeno; crveno – rezistentan; zeleno -intermedijarno osjetljiv; plavo- osjetljiv; bez boje – ne postoje CLSI smjernice za određivanje razine rezistencije na tu vrstu antibiotika (priručnik M45 *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*) (2016). ERI – eritromicin, AZI- azitromicin, KLA -klaritromicin, TET – tetraciklin, AMP-ampicilin, CIPRO – ciprofloksacin.

Fenotipske i genotipske karakteristike analiziranih izolata porijeklom s lokacije ispusta prikazane su u Tablici 9. Rezultati su pokazali da je gen *ermB*, koji je detektiran u najvećem broju izolata s lokacije ispusta (Slika 6.A.), pronađen u 11 različitih rodova i to najviše u rodovima *Enterococcus* i *Streptococcus*. Gen *ermF*, koji također dominira među izolatima na ovoj lokaciji, pronađen je u 8 rodova uključujući *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Enterococcus*, *Trichococcus*, *Chryseobacterium*, *Brevundimonas*, *Citrobacter* i *Dietzia*. Svi ovi izolati su pokazali visoku rezistenciju na sva tri ispitivana makrolida (MIK>128 mg/L). Pored makrolidne rezistencije, neki izolati koji su posjedovali gen *ermB* pokazali su rezistenciju na još jednu skupinu antibiotika, na primjer, na peniciline (ampicilin - *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*), fluorokinolone (ciprofloksacin - *Microbacterium*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Enterococcus avium*, *Aerococcus viridans*) ili tetracikline (tetraciklin - *Microbacterium esteraromaticum*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus*) dok su neki bili rezistentni na još dvije skupine antibiotika (*Enterococcus* i *Lysinibacillus fusiformis*).

Tablica 9. Raspodjela detektiranih gena za rezistenciju na makrolide i profil rezistencije u skupini izolata s lokacije ispusta.

Koljeno	Rod ili vrsta izolata	Broj izolata	Geni za makrolidnu rezistenciju	MIK (mg/L)					
				ERI	AZI	KLA	TET	AMP	CIPRO
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	1	<i>ermF</i>	>128	>128	32	8	<2	<0.25
	<i>Dietzia</i> sp.	1	<i>ermF+mphE</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>Microbacterium</i> sp.	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	8	128	4
			<i>mefA</i>	64	64	16	<2	<2	<0.25
	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	64	64	1
			<i>ermB</i>	>128	>128	>128	4	64	4
	<i>Microbacterium keratanolyticum</i>	1	<i>hflX</i>	>128	>128	>128	<2	128	<0.25
	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	1	<i>ermF</i>	>128	>128	>128	<2	>128	0.5
			<i>ermF</i>	>128	>128	>128	<2	>128	1
			<i>mphE</i>	>128	>128	>128	<2	64	16
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1	<i>hflX</i>	>128	>128	>128	<2	16	1
			<i>ermF+msrE</i>	>128	>128	>128	<2	16	1
			<i>ermF</i>	>128	>128	>128	<2	32	1
	<i>Micrococcus aloeverae</i>	1	<i>msrE</i>	64	4	32	<2	>128	8
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	8	64	4
			<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	4	1
<i>Tessaracoccus flavescens</i>	1	<i>mphE</i>	8	64	<2	<2	<2	<0.25	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	64	2	
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	1	<i>ermB+msrE</i>	64	>128	128	<2	>8	<0.25
	<i>Bacillus cereus</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	128	<2	>128	<0.25
	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	1	<i>ermB+ermF</i>	>128	>128	>128	<2	<2	<0.25
			<i>ermB</i>	>128	>128	>128	32	64	2
	<i>Enterococcus</i> sp.	1	<i>ermB</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			<i>ermB+mefC</i>	>128	>128	>128	16	64	<0.25
	<i>Enterococcus asini</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	64	2
	<i>Enterococcus avium</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	64	4
	<i>Streptococcus</i> sp.	3	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	1	<0.25
			<i>ermB</i>	>8	>128	>128	<2	1	<0.25
			<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	>128	<0.25
	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	1	<i>ermF</i>	>128	>128	>128	<2	16	<0.25
	<i>Trichococcus</i> sp.	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	<2	<0.25
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	<i>msrA+msrE</i>	>8	<2	<2	<2	<2	<0.25
<i>Lactococcus lactis</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	128	<2	1	<0.25	
<i>Aerococcus viidans</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	4	64	4	
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i> sp.	1	<i>ermF+msrD</i>	>128	>128	>128	<2	64	<0.25
		1	<i>ermF</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		1	<i>msrD</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Flavhumibacter</i> sp.	1	<i>msrA+msrE</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Proteobacteria	<i>Acidovorax</i> sp.	1	<i>hflX</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	<i>msrE+mphE</i>	<2	<2	<2	<2	<2	<0.25
	<i>Rhodobacter</i> sp.	1	<i>msrE+mphE</i>	16	16	<2	<2	<2	<0.25
	<i>Brevundimonas b ullata</i>	1	<i>ermF</i>	<2	<2	<2	<2	<2	<0.25
			<i>msrE</i>	>128	>128	64	<2	<2	<0.25
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	<i>ermB</i>	>128	>128	>128	<2	128	<0.25
	<i>Comamonas</i> sp.	1	<i>msrE+mphE</i>	>128	>128	32	<2	<2	<0.25
	<i>Comamonas denitrificans</i>	1	<i>msrE+mphE</i>	>128	32	16	<2	<2	<0.25
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	<i>msrE+mphE</i>	>128	>128	128	<2	64	<0.25
			<i>ermF+msrE+mphE</i>	>128	128	128	<2	>128	<0.25
			<i>msrE+mphE</i>	>128	128	128	<2	128	<0.25
	<i>Acidovorax</i> sp.	1	<i>mefA+msrE+mphE+hflX</i>	>128	>128	>128	<2	128	<0.25
			<i>msrE+mphE</i>	>128	>128	>128	<2	16	<0.25
	<i>Neisseria</i> sp.	1	<i>mphE</i>	64	16	32	<2	<2	<0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	<i>msrE</i>	128	128	128	<2	<2	16
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1	<i>mphE</i>	>128	>128	64	<2	<2	<0.25
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1	<i>msrE+mphE</i>	128	8	32	<2	64	<0.25
	<i>Themomonas brevis</i>	1	<i>mphE</i>	>128	>128	32	<2	<2	<0.25

*ND – nije određeno; crveno – rezistentan; zeleno -intermedijarno osjetljiv; plavo- osjetljiv; bez boje – ne postoje *CLSI* smjernice za određivanje razine rezistencije na tu vrstu antibiotika (priručnik *M45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*) (2016). ERI – eritromicin, AZI- azitromicin, KLA -klaritromicin, TET – tetraciklin, AMP- ampicilin, CIPRO – ciprofloksacin.

Osim najviše zastupljenog gena *ermB*, geni *msrE* i *mphE* dominirali su među izolatima s lokacije ispusta. Za razliku od uzvodne lokacije na kojoj je prisutnost ovih gena potvrđena u rodovima *Acinetobacter*, *Bacillus* i *Microbacterium*, iz Tablice 9. proizlazi da su oba ova gena pronađena u čak 13 različitih rodova te dominiraju u rodovima *Citrobacter* i *Comamonas*. Profil rezistencije na analizirane antibiotike bio je, međutim, varijabilan među spomenutim izolatima. Interesantno, od ukupno 18 izolata u kojima su detektirani klasteri od dva ili više rezistentnih gena, njih čak 10 pripadalo je koljenu *Proteobacteria* (rodovi: *Acinetobacter*, *Rhodobacter*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter* i *Acidovorax*). Većina tih proteobakterija posjedovala je genski klaster *msrE-mphE*. Međutim, iako je većina proteobakterijskih izolata pokazivala visoke MIK vrijednosti za makrolide (uglavnom >128 mg/L), rezultati se ne mogu jasno interpretirati, jer za ove rodove nisu dostupne *CLSI* smjernice za određivanje razine rezistencije (priručnik M45 *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*) (2016).

Od ostalih slabije zastupljenih rezistentnih gena, gen *hflX* pronađen je u izolatima iz rodova poput *Microbacterium*, *Bacillus* i *Acidovorax*, koji su pokazali visoke MIK vrijednosti za ispitivane makrolide (>128 mg/L), sa izuzetkom izolata *Acidovorax* sp. za koji nije provedeno testiranje osjetljivosti na antibiotike. Nadalje, gen *msrD* detektiran je u samo dva izolata *Chryseobacterium* sp., a gen *mefC* u jednom izolatu roda *Enterococcus*.

Također, na temelju rezultata testiranja osjetljivosti na antibiotike i dostupnih *CLSI* smjernica za interpretaciju osjetljivosti, može se uočiti da je samo 6 izolata (10,3%) zadovoljilo kriterij višestruke rezistencije, odnosno bili su rezistentni (uključujući i umjereno rezistentne) na barem jedan antibiotik iz minimalno tri različite skupine antibiotika. Ti izolati su pripadali rodu *Enterococcus* (4 izolata), te rodovima *Lysinibacillus* (1 izolat) i *Microbacterium* (1 izolat), a svi su posjedovali gen *ermB*, od čega je jedan enterokok posjedovao još i *mefC*.

7.3.2. Klinički izolati

Kao što je spomenuto u poglavlju 7.2.2., od 90 kliničkih rezistentnih izolata uključenih u ovo istraživanje, geni koji kodiraju rezistenciju na makrolide detektirani su u 56,7% izolata, većinom streptokoka i u manjem udjelu stafilokoka (Tablica 10.). Iz raspodjele rezistentnih gena u identificiranim kliničkim izolatima, prikazane u Tablici 10. proizlazi da je gen *ermB* detektiran u najvećem broju izolata (43%), pri čemu najviše u vrsti *Streptococcus pyogenes*. Slijedi gen *msrD* u 37%, gen *mefA* u 15% i gen *mefC* u 11% izolata, dok su ostali geni (*mphE*, *ermC*, *msrA* i *ermF*) zastupljeni s ≤5%. Najveći broj traženih gena detektiran je u izolatima koji pripadaju vrstama *Streptococcus dysgalactiae* (*ermB*, *msrA*, *msrD*, *mefA*, *mefC* i *mphE*) i *Streptococcus pyogenes* (*ermB*, *ermC*, *msrD*, *mefA* i *mefC*). U vrstama *Streptococcus salivarius* i *Streptococcus pneumoniae* potvrđeni su isti geni (*ermB*, *msrD* i *mefA*), pri čemu je u izolatu vrste *Streptococcus salivarius* potvrđen još i gen *mefC*. Gen *ermF* potvrđen je samo u izolatu vrste *Streptococcus agalactiae*, u kojem je detektiran i gen *ermB*. Geni *msrD* i *mefA* potvrđeni su u izolatu vrste *Streptococcus anginosus*. U izolatu vrste *Staphylococcus*

epidermidis potvrđena su tri gena (*ermC*, *msrA* i *mefC*), dok je u izolatu vrste *Staphylococcus aureus* pronađen samo gen *mefA*.

Tablica 10. Raspodjela kliničkih izolata koji nose gene za makrolidnu rezistenciju po bakterijskoj vrsti.

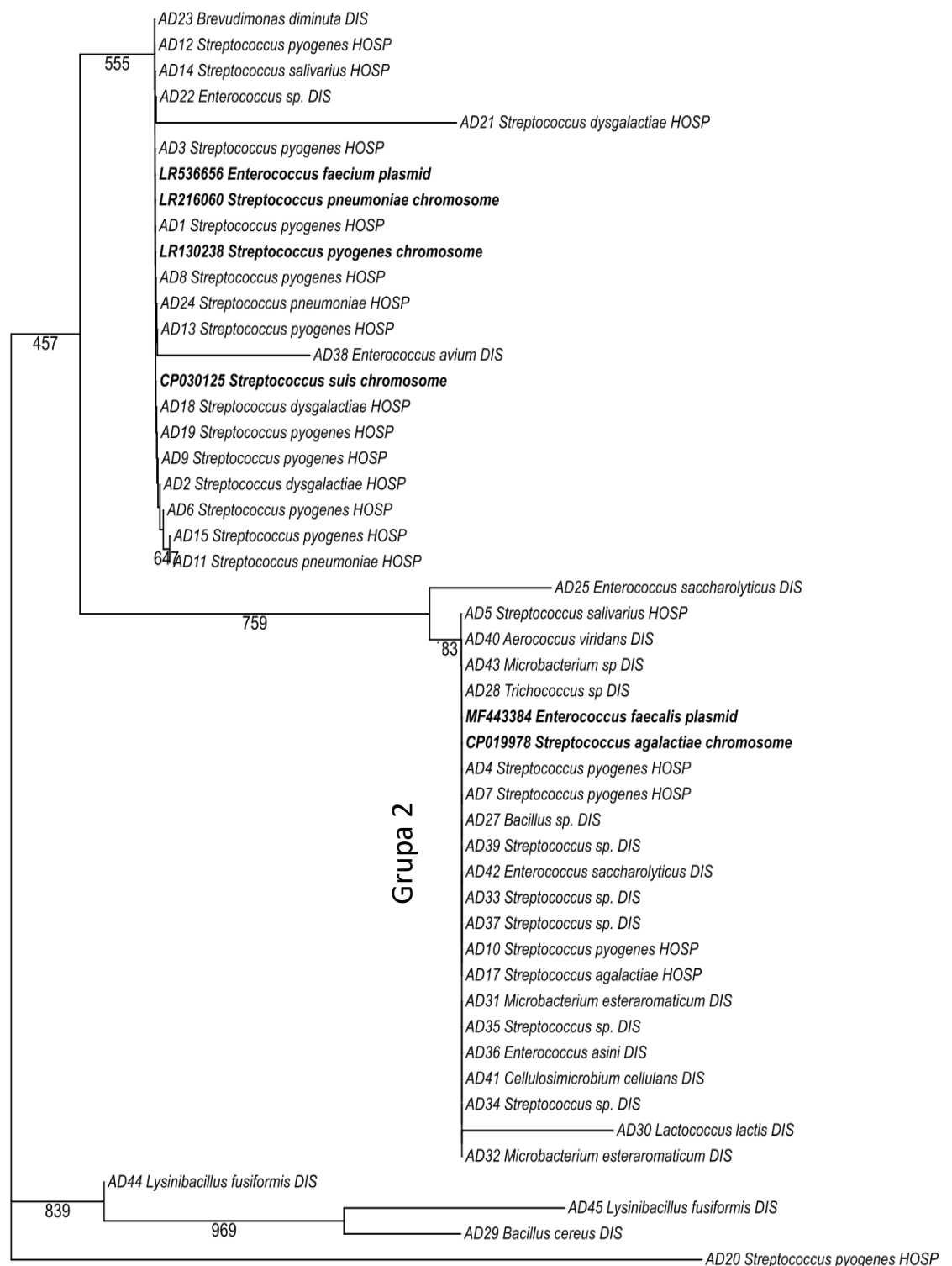
Izolat Geni	Broj izolata s određenim genom							
	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermF</i>	<i>msrA</i>	<i>msrD</i>	<i>mefA</i>	<i>mefC</i>	<i>mphE</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	13	1	-	-	5	3	7	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3	-	-	1	7	5	2	4
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	-	-	-	4	4	1	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	-	-	-	2	1	-	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	-	1	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	1	-	1	-	-	1	-
UKUPAN BROJ IZOLATA S	22	2	1	2	19	15	11	5
% IZOLATA S GENOM	43%	4%	2%	4%	37%	29%	22%	10%

7.3.3. Sekvenciranje gena *ermB* porijeklom iz okolišnih i kliničkih izolata

Od 11 gena za rezistenciju na makrolide analiziranih u ovom radu, gen *ermB* je odabran za daljnju analizu sekvenciranjem, jer je bio najzastupljeniji među okolišnim izolatima sa zagađene lokacije (ispust) i u kliničkim izolatima streptokoka. Filogenetskom analizom nukleotidnih sekvenci gena *ermB*, prikazanom na Slici 9., utvrđeno je grupiranje sekvenci u

dvije skupine od kojih je jedna uključivala većinom *ermB* sekvence okolišnih izolata sa ispusta, dok je druga skupina obuhvaćala većinom *ermB* sekvence kliničkih izolata lokacije.

Tree scale: 0.001



Slika 9. Filogenetsko stablo dobiveno usporedbom sekvenci gena *ermB* iz kliničkih i okolišnih izolata s lokacije ispusta te reprezentativnih *ermB* sekvenci (prikazane podebljano) iz NCBI baze podataka. Stablo je izgrađeno metodom povezivanja susjeda (engl. *Neighbor joining*) pomoću računalnog programa *Mega X*. Podrška za grananja unutar stabla određena je na temelju 1000 ponavljanja. DIS označava izolate s lokacije ispusta, dok su klinički izolati označeni HOSP.

8. RASPRAVA

U ovom radu analizirana je zbirka izolata sačinjena od 228 okolišnih i 90 kliničkih izolata koji su ispoljavali rezistenciju na makrolidni antibiotik azitromicin. Okolišni izolati prikupljeni na prikladnim selektivnim podlogama, potjecali su iz sedimenta rijeke Save s lokacije ispusta otpadnih voda iz proizvodnje azitromicina i lokacije smještene uzvodno od ispusta (kontrolna lokacija). Prema rezultatima Milaković i sur. (2019), sediment rijeke Save je na mjestu ispusta industrijskih otpadnih voda zagađen makrolidnim antibioticima (do 23 mg/kg), posebno azitromicinom i eritromicinom, koji bi mogli potaknuti razvoj i širenje makrolidne rezistencije među bakterijama sedimenta. Klinički izolati analizirani u ovom radu uključivali su najučestalije bakterijske patogene dišnog sustava (streptokoke i stafilokoke) koji su bili rezistentni na makrolide i prikupljeni u periodu od 2014. do 2018. godine u Referentnom centru za praćenje bolničke rezistencije na antibiotike pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Budući da mnogi geni za rezistenciju na antibiotike koji cirkuliraju među ljudskim patogenima potječu iz okolišnih bakterija (Forsberg i sur., 2012; Zhou i sur., 2018), osnovni cilj ovog istraživanja bio je usporediti mehanizme makrolidne rezistencije u izolata izloženih visokom selektivnom pritisku makrolida, i to onih porijeklom iz zagađenog okoliša i bolničkih sredina u RH.

Uzgojem bakterija iz sedimenta rijeke Save na selektivnim hranjivim podlogama poput R2A, Mueller-Hinton i Columbia agara, dobiven je veći broj bakterija rezistentnih na azitromicin na lokaciji ispusta u usporedbi s kontrolnom lokacijom. Ovi rezultati bi mogli biti posljedica unosa rezistentnih populacija putem otpadne vode, ali i selekcije prirodnih populacija iz sedimenta kao odgovor na visoki selektivni pritisak makrolida. Do sličnih spoznaja došli su i Flach i sur., (2015) koji su uočili veći udio kultivabilnih rezistentnih bakterija u riječnom sedimentu zagađenom antibioticima iz skupine fluorokinolona u usporedbi sa kontrolnim, nezagađenim sedimentom.

Na osnovu taksonomske analize na razini koljena vidljivo je da je na lokaciji ispusta došlo do značajnih promjena u zastupljenosti koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria* u usporedbi sa uzvodnom lokacijom. Smanjenje udjela rezistentnih bakterija iz koljena *Firmicutes* na lokaciji ispusta je u suprotnosti s rezultatima Milaković i sur. (2019) koji su potvrdili obogaćenje tog koljena u sedimentu na istoj lokaciji. Međutim autori nisu uzgajali prisutne bakterije već su izolirali ukupnu DNA iz sedimenta i sekvencirali prisutne gene za 16S rRNA. Mogući razlog postojeće razlike u zastupljenosti *Firmicutes* mogao bi se objasniti negativnim utjecajem primijenjenih hranjivih podloga (nedostatan izvor nutrijenata) ili uvjeta uzgoja na zastupljenost koljena *Firmicutes* u postupku izolacije bakterija. Stoga bi se u nastavku istraživanja, s ciljem determinacije još većeg broja izolata iz većeg broja koljena, trebao koristiti veći broj različitih hranjivih podloga i/ili uvjeta uzgoja. Nasuprot tome, rezultati su pokazali da je na lokaciji ispusta došlo do značajnog porasta udjela rezistentnih bakterija iz koljena *Proteobacteria* (razredi α -, β - i γ -*Proteobacteria*). Slični rezultati potvrđeni su i u drugim istraživanjima gdje je zagađenje vodenog okoliša antibioticima (tetraciklinima, sulfonamidima i fluorokinolonima) dovelo do obogaćenja bakterija iz ovog koljena (Li i sur.,

2010; Xiong i sur., 2015). Razlog tome bi mogla biti činjenica da su mnoge proteobakterije prirodno rezistentne na mnoge antibiotike, ali i imaju vrlo plastičan genom te lako primaju dodatne gene za rezistenciju horizontalnim prijenosom gena (Berendonk i sur., 2015).

Na razini roda, uočena je veća raznolikost bakterijske populacije sedimenta na lokaciji ispusta (31 rod) u usporedbi sa uzvodnom lokacijom (11 rodova). Kao što je gore spomenuto, razlog tome vjerojatno je unos rezistentnih bakterija u sediment rijeke Save putem otpadne vode (Bielen i sur., 2017), ali i umnožavanje rezistentnih bakterija iz sedimenta na lokaciji ispusta u usporedbi s kontrolnom lokacijom (Milaković i sur., 2019). Pritom se, na lokaciji ispusta, osim visoke koncentracije organske tvari i nutrijenata (dušik, fosfor) koji pogoduju rastu i razvoju različitih bakterija, posebno ističe visoka koncentracija makrolidnih antibiotika koja bi mogla promijeniti strukturu bakterijske zajednice putem selekcije onih bakterija koje imaju gene za rezistenciju i daljnjeg širenja tih gena među bakterijama sedimenta (Gonzalez-Plaza i sur., 2019).

Bez obzira na razlike u bioraznolikosti, na obje lokacije dominirale su rezistentne bakterije iz roda *Microbacterium*. Osim toga, na lokaciji ispusta dominirale su kultivabilne bakterije iz roda *Cellulosimicrobium* (9%) koje nisu izolirane s uzvodne lokacije, vjerojatno zbog niskog udjela u ukupnoj populaciji ili su unesene u sediment putem otpadne vode. Bharagava i Mishra (2018) naglašavaju dominaciju bakterija iz roda *Cellulosimicrobium* u okolišu zagađenom teškim metalima i antibioticima zbog posjedovanja višestrukih gena za rezistenciju na antibiotike i teške metale. S obzirom na to da je u prijašnjem istraživanju (Milaković i sur., 2019) utvrđeno onečišćenje sedimenta na lokaciji ispusta ne samo antibioticima već i teškim metalima, posebice Cu i Zn, to bi mogao biti razlog povećane detekcije roda *Cellulosimicrobium*.

Nadalje, u ovom su istraživanju identificirani najučestaliji bakterijski patogeni, uglavnom dišnog sustava, koji su prikupljeni u hrvatskim bolnicama i koji su pokazivali smanjenu osjetljivost na azitromicin. Na temelju rezultata sekvenciranja 16S rRNA gena vidljivo je da je većina tih kliničkih izolata pripadala rodu *Streptococcus* (93%), vrsti *S. pyogenes*. Ta bakterijska vrsta često izaziva upale grla, ždrijela, šarlah, ali može izazvati i infekcije rana i kože, upalu pluća i dr. (Barnett i sur., 2019; Laabei i Ermert, 2018.). Makrolidni antibiotici se najčešće koriste u liječenju infekcija dišnih putova uzrokovanih Gram pozitivnim bakterijama, ali i kao alternativna terapija kod ljudi koji su alergični na penicilin (Golkar i sur., 2018). Međutim, zbog njihove prekomjerne uporabe, najčešće u virusnim infekcijama dišnog sustava, uslijedio je porast rezistencije kod najučestalijih bakterijskih patogena dišnog sustava, streptokoka i stafilokoka (Fyfe i sur., 2016).

Prikupljene kliničke izolate iz ovog istraživanja karakterizirala je smanjena osjetljivost na makrolidne antibiotike, ali u svega 56,7 % analiziranih izolata detektirani su analizirani geni za rezistenciju na makrolide. Daljnjom PCR analizom tih izolata potvrđena je prisutnost četiri mehanizma rezistencije, pri čemu je u najvećem broju izolata detektiran mehanizam posredovan efluks pumpama (28,9%) koje kodiraju geni *mefA* i *mefC*. Gen *mefA* bio je najviše

zastupljen u vrsti *Streptococcus dysgalactiae*, dok je *mefC* bio uglavnom detektiran u vrsti *Streptococcus pyogenes*. Nadalje, prema zastupljenosti uslijedio je mehanizam posredovan djelovanjem enzima metiltransferaza (27,7% izolata) koje su uglavnom bile kodirane genom *ermB* i detektirane u vrsti *Streptococcus pyogenes* te mehanizam posredovan zaštitnim proteinima ribosoma (23,3%). Ovaj posljednji mehanizam bio je uglavnom posredovan genom *msrD* koji je detektiran najviše u vrstama *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus dysgalactiae*. Zajednička pojava *mefA* i *msrD* gena često se veže za kliničke izolate u znanstvenoj literaturi, jer se nalaze na istom plazmidu (Roberts, 2011). Također, Fyfe i sur. (2016) navode da ta dva gena zajedno sa genom *ermB* dominiraju u kliničkim izolatima streptokoka, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Prema tome, temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da je većina analiziranih kliničkih streptokoka, kao posljedica visokog selektivnog pritiska antibiotika u bolničkim sredinama u RH, razvila mehanizme rezistencije koji uključuju efluks pumpe, metiltransferaze i zaštitne proteine ribosoma, dok je mehanizam posredovan djelovanjem fosfotransferaza zastupljen u manjem broju analiziranih izolata. Također, analizirani klinički streptokoki su kao jednu od strategija za preživljavanje tijekom tretmana antibiotikom stvorili kombinaciju više, najčešće dva različita mehanizma rezistencije.

Gledajući bakterijsku populaciju okolišnih izolata koji su ispoljavali rezistenciju na azitromicin, njih 46,8% s lokacije ispusta posjedovalo je neki od analiziranih gena za makrolidnu rezistenciju, dok je samo 16,3% izolata sa uzvodne lokacije imalo ciljani/e gen/e za rezistenciju. Lekunberri i sur. (2017) su dobili slične rezultate u svom istraživanju gdje je na lokaciji ispusta komunalnih otpadnih voda (Španjolska), koja je zagađenija antibioticima u odnosu na uzvodnu lokaciju, utvrđen veći broj gena za rezistenciju na antibiotike, uključujući makrolide. Daljnja analiza i usporedba mehanizama rezistencije između izolata s lokacije ispusta i uzvodne lokacije pokazala je da je na lokaciji ispusta došlo do znatnog obogaćenja tri mehanizma makrolidne rezistencije. Pritom je dominirao mehanizam posredovan djelovanjem enzima metiltransferaza koje su većinom kodirali geni *ermB* i *ermF*, zatim je uslijedio mehanizam posredovan zaštitnim proteinima kodiranim uglavnom genom *msrE* te u konačnici mehanizam posredovan djelovanjem enzima fosfotransferaza koje je kodirao gen *mphE*. Ovi rezultati upućuju na zaključak da su se ova tri mehanizma pokazala kao najefikasniji načini kojima izolati na lokaciji ispusta osiguravaju rezistenciju na vrlo visoke koncentracije makrolida. Pritom mehanizmi posredovani metiltransferazama i zaštitnim proteinima ribosoma dominiraju među okolišnim i bolničkim izolatima što bi moglo značiti da su to jedni od najefikasnijih načina za borbu bakterija protiv vrlo visokih koncentracija makrolida.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su nadalje da je gen *ermB* odgovoran za rezistenciju većine izolata s lokacije ispusta kao i za rezistenciju kliničkih izolata. U skladu s tim, van Hoek i sur. (2011) navode da je gen *ermB* najčešće odgovoran za rezistenciju na makrolidne antibiotike. Spomenuti gen je u ovom radu detektiran u izolatima s lokacije ispusta koji su pripadali rodovima *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus* i *Streptococcus*, dok u izolatima s uzvodne lokacije nije detektiran. U literaturi se također navodi učestala zastupljenost gena *ermB* u okolišnim izolatima, naročito u rodovima *Enterococcus* i *Streptococcus* (Jensen i sur., 2002;

Hayes i sur., 2005), a isto tako, velika zastupljenost gena *ermB* zabilježena je u okolišnim izolatima porijeklom sa ispusta komunalnih otpadnih voda u Kini (Liu i sur., 2018). Treba naglasiti da su u humanoj medicini enterokoki vrlo visoko na listi najčešćih uzročnika bolničkih infekcija i kod njih je gen *ermB* odgovoran za visoku stopu stečene rezistencije na eritromicin (Tian i sur., 2019). Osim toga, u literaturi se kao problem ističe velika sposobnost stjecanja novih mehanizama rezistencije u određenih bakterijskih vrsti iz rodova *Enterococcus* i *Streptococcus* (van Hoek i sur., 2011; Tian i sur., 2019).

Iako je mehanizam posredovan genom *ermB* dominantan mehanizam makrolidne rezistencije kod izolata s lokacije ispusta, dobiveni rezultati ukazuju da prisutnost enzima fosfotransferaza (gen *mphE*) i proteina iz porodice Msr (geni *msr*) također igra bitnu ulogu u pojavi rezistencije. Duijkeren i sur. (2018) navode da geni iz *msr* grupe pokazuju manju razinu rezistencije u odnosu na gene iz *erm* grupe pa bi to mogao biti razlog veće zastupljenosti gena *erm* nego gena *msr* u izolata s lokacije ispusta. Isti autori ističu da je mehanizam rezistencije putem djelovanja fosfotransferaza najčešće prisutan u Gram-negativnim bakterijama, što je potvrđeno i u ovom istraživanju budući da je gen *mphE* detektiran u izolatima iz rodova kao što su *Neisseria*, *Thermomonas*, *Comamonadaceae*, *Flaviumibacter*, *Stenotrophomonas*, i *Citrobacter*, koji svi pripadaju skupini Gram-negativnih bakterija i potječu s lokacije ispusta. Budući da neki od ovih rodova uključujući *Neisseria* i *Stenotrophomonas* sadrže patogene vrste, u slučaju prijenosa na ljude i bolesti, terapija makrolidima bi mogla biti nedjelotvorna (Unemo i Nicholas, 2012; Chang i sur., 2015).

Interesantno, 24% izolata s lokacije ispusta, većinom proteobakterija, razvilo je rezistenciju na makrolide kombinacijom gena *msrE* i *mphE*. Zajednička pojava ovih gena u okolišnim izolatima vjerojatno je rezultat njihove povezanosti s plazmidima (Hayes-Plaza i sur., 2018, Nonaka i sur., 2012) i posljedično, njihova zajedničkog širenja među bakterijama. Spomenuta rezistencija posredovana kombinacijom zaštitnih proteina ribosoma i fosfotransferaza (kombinacija gena *msrE-mphE*) djelomično se poklapa s dvostrukim mehanizmima rezistencije zabilježenim u kliničkim izolatima koji su uključivali kombinirano djelovanje zaštitnih proteina i efluks pumpi (kombinacija gena *msrD-mefA*). Također, treba naglasiti da je osim dvostrukih mehanizama makrolidne rezistencije, u kliničkim izolatima i izolatima sa lokacije ispusta, potvrđena i kombinacija tri ili čak četiri različita mehanizma makrolidne rezistencije. Ovo zapažanje upućuje na zaključak da bi razvoj višestrukih mehanizama rezistencije mogao biti jedan od načina za borbu bakterija protiv visokih koncentracija makrolida. Pritom je kombinacija gena *erm-msr-mph* uočena u okolišnih i kliničkih izolata, dok je kombinacija gena *erm-msr-mef* zabilježena samo u kliničkih izolata.

Analizirajući profile rezistencije okolišnih izolata, kod nekih izolata sa lokacije ispusta poput rodova *Enterococcus* i *Lysinibacillus*, uočen je višestruko-rezistentan fenotip tj. rezistencija na barem jedan antibiotik iz 3 različite skupine. Ovo zapažanje upućuje na zaključak da je višestruka rezistencija u rodovima *Enterococcus* i *Lysinibacillus* posljedica prisutnosti više gena za rezistenciju na različite skupine antibiotika. Već je spomenuto da su vrste iz roda

Enterococcus česti uzročnici bolničkih infekcija (Tian i sur., 2019), a Goel i sur. (2016) te Kwon i sur. (2012) potvrdili su višestruku rezistenciju kod vrsta *Enterococcus saccharolyticus* i *Enterococcus avium*, koja je utvrđena i u okolišnih izolata u ovom istraživanju. Kwon i sur. (2012) posebice ističu vrstu *Enterococcus saccharolyticus* kao potencijalan spremnik rezistentnih gena budući da je pokazivala rezistenciju na 5 različitih skupina antibiotika.

S obzirom da je u ovom istraživanju gen *ermB* dominirao među okolišnim izolatima sa zagađene lokacije (ispust) i u kliničkim izolatima streptokoka, analizirane su nukleotidne sekvence tog gena kako bi se procijenila njihova međusobna sličnost. Filogenetskom analizom utvrđeno je grupiranje sekvenci u dvije skupine od kojih je jedna obuhvaćala većinom okolišne *ermB* sekvence, a druga većinom kliničke sekvence. No, bez obzira na grupiranje, razlike u sekvencama između skupina bile su vrlo male što ukazuje na vrlo veliku sličnost sekvenci *ermB* gena (>98%) iz okolišnih i kliničkih izolata. Ti rezultati nadalje upućuju na to da je sediment zagađen makrolidima rezervoar rezistencije posredovane genom *ermB* koja bi se mogla širiti izvan okoliša. Česta lokalizacija gena *ermB* na plazmidima u sklopu transpozona potkrepljuje tu pretpostavku (Berglund, 2015; Rahube i sur., 2014). Iako se u znanstvenoj literaturi navodi da geni za rezistenciju koji kruže među kliničkim patogenima potječu iz okoliša (Poirel i sur., 2005; Wright, 2017), na temelju rezultata ovog rada nije moguće donijeti zaključak o putevima tog prijenosa što čini dobru osnovu za buduća istraživanja.

9. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom istraživanju možemo zaključiti slijedeće:

- Vodeni okoliš izložen zagađenju makrolidnim antibioticima putem otpadnih voda iz lokalne farmaceutske industrije predstavlja spremnik bakterija rezistentnih na azitromicin, uključujući i klinički relevantne patogene iz roda *Streptococcus*;
- Različita struktura i veća raznolikost kultivabilne bakterijske zajednice s lokacije ispusta u odnosu na uzvodnu lokaciju upućuje na vjerojatan unos rezistentnih bakterija putem otpadne vode, ali i selekciju bakterija iz sedimenta kao odgovor na visoki selektivni pritisak makrolida i drugih toksičnih spojeva iz proizvodnje azitromicina;
- U usporedbi s izolatima s kontrolne lokacije, među izolatima s lokacije ispusta došlo je do značajnog porasta zastupljenosti tri mehanizma rezistencije na makrolide posredovana metiltransferazama (ErmB i ErmF), zaštitnim proteinima bakterijskog ribosoma (MsrE) i fosfotransferazama (MphE).
- Iako je većinu analiziranih okolišnih izolata odlikovao jedan mehanizam rezistencije na makrolide, u izolata s lokacije ispusta zabilježena je veća pojava dvostrukih mehanizama rezistencije u odnosu na izolate s kontrolne lokacije. Pojava trostrukih i četverostrukih mehanizama zamijećena je samo u izolata s lokacije ispusta što upućuje na važnost stjecanja višestrukih mehanizama rezistencije u prilagodbi bakterija na uvjete života u kojima je okoliš pun antibiotika;
- Najzastupljeniji mehanizam makrolidne rezistencije u analiziranih kliničkih izolata (streptokoka i stafilokoka) je mehanizam posredovan efluks pumpama iz porodice Mef. Slično kao kod izolata s lokacije ispusta, preostala dva dominantna mehanizma uključuju metiltransferaze (prvenstveno ErmB) i zaštitne proteine ribosoma (uglavnom MsrD);
- Slično okolišnim izolatima s lokacije ispusta, kliničke izolate također odlikuje pojava višestrukih mehanizama makrolidne rezistencije što ukazuje na sličan način borbe bakterija protiv visokih koncentracija makrolida;
- Utvrđena visoka sličnost nukleotidnih sekvenci gena *ermB* koji dominira među okolišnim izolatima s lokacije ispusta i kliničkim izolatima, ukazuje na mogućnost širenja tog gena izvan okoliša.

10. LITERATURA

- 1) Abram, Maja, Ivana Škrobonja, Damir Ambrožić, Davorka Repac-Antić, Marina Bubonja Šonje. 2018. "Eskape – Bacteria That Alert the World." *Medicina Fluminensis* 54(3):242–53.
- 2) Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215(3):403–10.
- 3) Andrašević Tambić A. 2007. "Otpornost bakterija na antibiotike – vodeći problem medicine u 21. stoljeću." *Medicina Fluminensis* 43(1):7-14.
- 4) Andrašević Tambić A, Tambić T, Katalinić-Janković V, Payerl Pal M, Bukovski S, Šoprek S. 2017. "Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017.g." *Akademija medicinskih znanosti Hrvatske*.
- 5) Arthur, Michel, Denise Autissier, Patrice Courvalin. 1986. "Analysis of the Nucleotide Sequence of the EreB Gene Encoding the Erythromycin Esterase Type II." *Nucleic Acids Research* 14(12):4987–99.
- 6) Barnett, T. C., A. C. Bowen, J. R. Carapetis. 2019. "The Fall and Rise of Group A Streptococcus Diseases." *Epidemiology and Infection* 147.
- 7) Bengtsson-Palme, Johan, Fredrik Boulund, Jerker Fick, Erik Kristiansson, D. G. Joakim Larsson. 2014. "Shotgun Metagenomics Reveals a Wide Array of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Elements in a Polluted Lake in India." *Frontiers in Microbiology* 5(DEC).
- 8) Berglund, Björn. 2015. "Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Genes and Correlation to Anthropogenic Contamination with Antibiotics." *Infection Ecology & Epidemiology* 5(1):28564.
- 9) Bharagava, Ram Naresh, Sandhya Mishra. 2018. "Hexavalent Chromium Reduction Potential of Cellulosimicrobium Sp. Isolated from Common Effluent Treatment Plant of Tannery Industries." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147:102–9.
- 10) Bielen, Ana, Ana Šimatović, Josipa Kosić-Vukšić, Ivan Senta, Marijan Ahel, Sanja Babić, Tamara Jurina, Juan José González Plaza, Milena Milaković, Nikolina Udiković-Kolić. 2017. "Negative Environmental Impacts of Antibiotic-Contaminated Effluents from Pharmaceutical Industries." *Water Research* 126:79–87.
- 11) Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, Laura J. V. Piddock. 2015. "Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Nature Reviews Microbiology* 13(1):42–51.
- 12) Carlsson, Gunnar, Stefan Örn, D. G. Joaki. Larsson. 2009. "Effluent from Bulk Drug Production Is Toxic to Aquatic Vertebrates." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2656–62.
- 13) Cattoir, Vincent i Roland Leclercq. 2017. "Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins." Pp. 269–80 in *Antimicrobial Drug Resistance*. Springer International Publishing.

- 14) Chang, Ya Ting, Chun Yu Lin, Yen Hsu Chen, Po Ren Hsueh. 2015. "Update on Infections Caused by *Stenotrophomonas Maltophilia* with Particular Attention to Resistance Mechanisms and Therapeutic Options." *Frontiers in Microbiology* 6(SEP).
- 15) CLSI. 2014. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 16) CLSI. 2016. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 17) Dcosta, Vanessa M., Christine E. King, Lindsay Kalan, Mariya Morar, Wilson W. L. Sung, Carsten Schwarz, Duane Froese, Grant Zazula, Fabrice Calmels, Regis Debruyne, G. Brian Golding, Hendrik N. Poinar, Gerard D. Wright. 2011. "Antibiotic Resistance Is Ancient." *Nature* 477(7365):457–61.
- 18) Dinos, George P. 2017. "The Macrolide Antibiotic Renaissance." *British Journal of Pharmacology* 174(18):2967–83.
- 19) van Duijkeren, Engeline, Anne-Kathrin Schink, Marilyn C. Roberts, Yang Wang, Stefan Schwarz. 2018. "Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents." *Microbiology Spectrum* 6(2).
- 20) Duval, Mélodie, Daniel Dar, Filipe Carvalho, Eduardo P. C. Rocha, Rotem Sorek, Pascale Cossart. 2018. "HflXr, a Homolog of a Ribosome-Splitting Factor, Mediates Antibiotic Resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(52):13359–64.
- 21) Dyer, Scott D., Charles Peng, Drew C. McAvoy, Nick J. Fendinger, Patrick Masscheleyn, Lourdes V. Castillo, Jose Marie U. Lim. 2003. "The Influence of Untreated Wastewater to Aquatic Communities in the Balatuin River, The Philippines." *Chemosphere* 52(1):43–53.
- 22) Eraković Haber, Vesna. 2011. "Makrolidi - Više Od Antibiotika." *Infektološki Glasnik* 31(1):29–39.
- 23) Espeli, Olivier i Kenneth J. Mariani. 2004. "Untangling Intracellular DNA Topology." *Molecular Microbiology* 52(4):925–31.
- 24) Falagas, M. E., S. K. Kasiakou, L. D. Saravolatz. 2005. "Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections." *Clinical Infectious Diseases* 40(9):1333–41.
- 25) Farrell, David J., Robert K. Flamm, Helio S. Sader, Ronald N. Jones. 2016. "Results from the Solithromycin International Surveillance Program (2014)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(6):3662–68.
- 26) Fick, Jerker, Hanna Söderström, Richard H. Lindberg, Chau Phan, Mats Tysklind, D. G. Joaki. Larsson. 2009. "Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water from Pharmaceutical Production." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2522–27.
- 27) Flach, Carl Fredrik, Anna Johnning, Ida Nilsson, Kornelia Smalla, Erik Kristiansson, D. G. Joaki. Larsson. 2015. "Isolation of Novel IncA/C and IncN Fluoroquinolone Resistance

- Plasmids from an Antibiotic-Polluted Lake.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(10):2709–17.
- 28) Forsberg, Kevin J., Alejandro Reyes, Bin Wang, Elizabeth M. Selleck, Morten O. A. Sommer, Gautam Dantas. 2012. “The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens.” *Science* 337(6098):1107–11.
 - 29) Fyfe, Corey, Trudy H. Grossman, Kathy Kerstein, Joyce Sutcliffe. 2016. “Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(10).
 - 30) Gaze, William Hugo i Michael Depledge. 2017. “Antimicrobial Resistance: Investigating the Environmental Dimension - Frontiers 2017: Emerging Issues of Environmental Concern.”
 - 31) Göbel, Anke, Angela Thomsen, Christa S. McArdell, Alfredo C. Alder, Walter Giger, Nicole Theiß, Dirk Löffler, Thomas A. Ternes. 2005. “Extraction and Determination of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Sewage Sludge.” *Journal of Chromatography A* 1085(2):179–89.
 - 32) Goel, Varun, Dinesh Kumar, Rajendra Kumar, Purva Mathur, Sarman Singh. 2016. “Community Acquired Enterococcal Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance Profile in North India.” *Journal of Laboratory Physicians* 8(1):50.
 - 33) Golkar, Tolou, Michal Zielinski, Albert M. Berghuis. 2018. “Look and Outlook on Enzyme-Mediated Macrolide Resistance.” *Frontiers in Microbiology* 9(AUG).
 - 34) Gomes, Cláudia, Sandra Martínez-Puchol, Noemí Palma, Gertrudis Horna, Lidia Ruiz-Roldán, Maria J. Pons, Joaquim Ruiz. 2017. “Macrolide Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on Azithromycin.” *Critical Reviews in Microbiology* 43(1):1–30.
 - 35) González-Plaza, Juan J., Ana Šimatović, Milena Milaković, Ana Bielen, Fabienne Wichmann, Nikolina Udiković-Kolić. 2018. “Functional Repertoire of Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic Manufacturing Effluents and Receiving Freshwater Sediments.” *Frontiers in Microbiology* 8(JAN).
 - 36) González-Plaza, Juan José, Khalid Blau, Milena Milaković, Tamara Jurina, Kornelia Smalla, Nikolina Udiković-Kolić. 2019. “Antibiotic-Manufacturing Sites Are Hot-Spots for the Release and Spread of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Receiving Aquatic Environments.” *Environment International* 130.
 - 37) Grenni, Paola, Valeria Ancona, Anna Barra Caracciolo. 2018. “Ecological Effects of Antibiotics on Natural Ecosystems: A Review.” *Microchemical Journal* 136:25–39.
 - 38) Gullberg, Erik, Sha Cao, Otto G. Berg, Carolina Ilbäck, Linus Sandegren, Diarmaid Hughes, Dan I. Andersson. 2011. “Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations” edited by M. Lipsitch. *PLoS Pathogens* 7(7):e1002158.
 - 39) Hayes, Joshua R., David D. Wagner, Linda L. English, Lewis E. Carr, Sam W. Joseph. 2005. “Distribution of Streptogramin Resistance Determinants among *Enterococcus Faecium* from a Poultry Production Environment of the USA.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(1):123–26.

- 40) Van Hoek, Angela H. A. M., Dik Mevius, Beatriz Guerra, Peter Mullany, Adam Paul Roberts, Henk J. M. Aarts. 2011. "Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview." *Frontiers in Microbiology* 2(SEP).
- 41) Høltje, J. V. 1998. "Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of Escherichia Coli." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62(1):181–203.
- 42) Jensen, Lars Bogø, Yvonne Agersø, Gitte Sengeløv. 2002. "Presence of Erm Genes among Macrolide-Resistant Gram-Positive Bacteria Isolated from Danish Farm Soil." *Environment International* 28(6):487–91.
- 43) Johnston, Nicole, Tariq Mukhtar, Gerard Wright. 2005. "Streptogramin Antibiotics: Mode of Action and Resistance." *Current Drug Targets* 3(4):335–44.
- 44) Kahne, Dan, Catherine Leimkuhler, Wei Lu, Christopher Walsh. 2005. "Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics." *Chemical Reviews* 105(2):425–48.
- 45) Kapoor, Garima, Saurabh Saigal, Ashok Elongavan. 2017. "Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians." *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 33(3):300–305.
- 46) Katz, Leonard i Gary W. Ashley. 2005. "Translation and Protein Synthesis: Macrolides." *Chemical Reviews* 105(2):499–527.
- 47) Kristiansson, Erik, Jerker Fick, Anders Janzon, Roman Grabic, Carolin Rutgersson, Birgitta Weijdegård, Hanna Söderström, D. G. Joakim Larsson. 2011. "Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements." *PLoS ONE* 6(2).
- 48) Kwon, Ka Hee, Sun Young Hwang, Bo Youn Moon, Young Kyung Park, Sook Shin, Cheol Yong Hwang, Yong Ho Park. 2012. "Occurrence of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes, and Distribution of Enterococcal Clonal Complex 17 from Animals and Human Beings in Korea." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(5):924–31.
- 49) Laabei, Maisem i David Ermert. 2018. "Catch Me If You Can: Streptococcus Pyogenes Complement Evasion Strategies." *Journal of Innate Immunity* 11(1):3–12.
- 50) Larsson, D. G. Joaki. 2014. "Pollution from Drug Manufacturing: Review and Perspectives." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1656).
- 51) Larsson, D. G. Joaki., Cecilia de Pedro, Nicklas Paxeus. 2007. "Effluent from Drug Manufactures Contains Extremely High Levels of Pharmaceuticals." *Journal of Hazardous Materials* 148(3):751–55.
- 52) Le-Minh, N., S. J. Khan, J. E. Drewes, R. M. Stuetz. 2010. "Fate of Antibiotics during Municipal Water Recycling Treatment Processes." *Water Research* 44(15):4295–4323.
- 53) Lekunberri, Itziar, Marta Villagrasa, José Luis Balcázar, Carles M. Borrego. 2017. "Contribution of Bacteriophage and Plasmid DNA to the Mobilization of Antibiotic Resistance Genes in a River Receiving Treated Wastewater Discharges." *Science of the Total Environment* 601–602:206–9.
- 54) Lewis, Kim. 2013. "Platforms for Antibiotic Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery*

- 12(5):371–87.
- 55) Li, Dong, Min Yang, Jianying Hu, Jing Zhang, Ruyin Liu, Xin Gu, Yu Zhang, Zhenyu Wang. 2009. "Antibiotic-Resistance Profile in Environmental Bacteria Isolated from Penicillin Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River." *Environmental Microbiology* 11(6):1506–17.
- 56) Li, Dong, Tao Yu, Yu Zhang, Min Yang, Zhen Li, Miaomiao Liu, Rong Qi. 2010. "Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River." *Applied and Environmental Microbiology* 76(11):3444–51.
- 57) Marathe, Nachiket P., Viduthalai R. Regina, Sandeep A. Walujkar, Shakti Singh Charan, Edward R.B. Moore, D. G. Joaki. Larsson, Yogesh S. Shouche. 2013. "A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria." *PloS One* 8(10).
- 58) Marathe, Nachiket P., Viduthalai R. Regina, Sandeep A. Walujkar, Shakti Singh Charan, Edward R. B. Moore, D. G. Joakim Larsson, Yogesh S. Shouche. 2013. "A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria" edited by Z. Zhou. *PLoS ONE* 8(10):e77310.
- 59) Milaković, Milena, Gisle Vestergaard, Juan J. González-Plaza, Ines Petrić, Ana Šimatović, Ivan Senta, Susanne Kublik, Michael Schloter, Kornelia Smalla, Nikolina Udiković-Kolić. 2019. "Pollution from Azithromycin-Manufacturing Promotes Macrolide-Resistance Gene Propagation and Induces Spatial and Seasonal Bacterial Community Shifts in Receiving River Sediments." *Environment International* 123:501–11.
- 60) Morar, Mariya, Kate Pengelly, Kalinka Koteva, Gerard D. Wright. 2012. "Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes." *Biochemistry* 51(8):1740–51.
- 61) Munita, JM, Arias, AA. 2016. "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Microbiol Spectr.*, 4(2):481-51.
- 62) Murray, Barbara E. 1990. "The Life and Times of the Enterococcus." *Clinical Microbiology Reviews* 3(1):46–65.
- 63) Newton, J, Fenton, K. 2015. "Health Matters – tackling antimicrobial resistance." *Public Health England*.
- 64) Noguchi, Norihisa, Yasunobu Tamura, Jin Katayama, Koji Narui. 1998. "Expression of the MphB Gene for Macrolide Phosphotransferase II from Escherichia Coli in Staphylococcus Aureus." *FEMS Microbiology Letters* 159(2):337–42.
- 65) Nonaka, L., F. Maruyama, S. Suzuki, M. Masuda. 2015. "Novel Macrolide-Resistance Genes, Mef(C) and Mph(G), Carried by Plasmids from Vibrio and Photobacterium Isolated from Sediment and Seawater of a Coastal Aquaculture Site." *Letters in Applied Microbiology* 61(1):1–6.
- 66) Nonaka, Lisa, Fumito Maruyama, Manabu Miyamoto, Masatoshi Miyakoshi, Ken

- Kurokawa, Michiaki Masuda. 2012. "Novel Conjugative Transferable Multiple Drug Resistance Plasmid PAQU1 from Photobacterium Damselae Subsp. Damselae Isolated from Marine Aquaculture Environment." *Microbes and Environments* 27(3):263–72.
- 67) Nordmann, Patrice, Marie Frédérique Lartigue, Laurent Poirel. 2008. "β-Lactam Induction of ISEcp1B-Mediated Mobilization of the Naturally Occurring BlaCTX-M β-Lactamase Gene of Kluyvera Ascorbata." *FEMS Microbiology Letters* 288(2):247–49.
- 68) Ojo, K. K., C. Ulep, N. Van Kirk, H. Luis, M. Bernardo, J. Leitao, M. C. Roberts. 2004. "The Mef(A) Gene Predominates among Seven Macrolide Resistance Genes Identified in Gram-Negative Strains Representing 13 Genera, Isolated from Healthy Portuguese Children." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(9):3451–56.
- 69) Omura, Satoshi. 2003. *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice: Second Edition*. Elsevier Inc.
- 70) Ounissi, Houria i Patrice Courvalin. 1985. "Nucleotide Sequence of the Gene EreA Encoding the Erythromycin Esterase in Escherichia Coli." *Gene* 35(3):271–78.
- 71) Pagès, Jean Marie, Chloë E. James, Mathias Winterhalter. 2008. "The Porin and the Permeating Antibiotic: A Selective Diffusion Barrier in Gram-Negative Bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 6(12):893–903.
- 72) Peterson, Elizabeth i Parjit Kaur. 2018. "Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens." *Frontiers in Microbiology* 9(NOV).
- 73) Pruden, Amy, D. G. Joakim Larsson, Alejandro Amézquita, Peter Collignon, Kristian K. Brandt, David W. Graham, James M. Lazorchak, Satoru Suzuki, Peter Silley, Jason R. Snape, Edward Topp, Tong Zhang, Yong Guan Zhu. 2013. "Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment." *Environmental Health Perspectives* 121(8):878–85.
- 74) Qiao, Min, Guang Guo Ying, Andrew C. Singer, Yong Guan Zhu. 2018. "Review of Antibiotic Resistance in China and Its Environment." *Environment International* 110:160–72.
- 75) Rahube, Teddie O., Laia S. Viana, Günther Koraimann, Christopher K. Yost. 2014. "Characterization and Comparative Analysis of Antibiotic Resistance Plasmids Isolated from a Wastewater Treatment Plant." *Frontiers in Microbiology* 5.
- 76) Ramirez, Maria S. i Marcelo E. Tolmasky. 2010. "Aminoglycoside Modifying Enzymes." *Drug Resistance Updates* 13(6):151–71.
- 77) Roberts, Marilyn C. 2008. "Update on Macrolide-Lincosamide-Streptogramin, Ketolide, and Oxazolidinone Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters* 282(2):147–59.
- 78) Roberts, Marilyn C. 2011. "Environmental Macrolide-Lincosamide-Streptogramin and Tetracycline Resistant Bacteria." *Frontiers in Microbiology* 2(MAR).
- 79) Seral, Cristina, Françoise Van Bambeke, Paul M. Tulkens. 2003. "Quantitative Analysis of Gentamicin, Azithromycin, Telithromycin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Oritavancin (LY333328) Activities against Intracellular Staphylococcus Aureus in Mouse J774 Macrophages." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(7):2283–92.

- 80) Sharkey, Liam K. R., Thomas A. Edwards, Alex J. O'Neill. 2016. "ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection." *MBio* 7(2).
- 81) Spänhoff, Bernd, Roland Bischof, Anne Böhme, Stefan Lorenz, Katharina Neumeister, Antje Nöthlich, Kirsten Küsel. 2007. "Assessing the Impact of Effluents from a Modern Wastewater Treatment Plant on Breakdown of Coarse Particulate Organic Matter and Benthic Macroinvertebrates in a Lowland River." *Water, Air, and Soil Pollution* 180(1–4):119–29.
- 82) Surette, Matthew D. i Gerard D. Wright. 2017. "Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome." *Annual Review of Microbiology* 71(1):309–29.
- 83) Taniguchi, Kazuo, Akio Nakamura, Kazue Tsurubuchi, Aki Ishii, Koji O'Hara, Tetsuo Sawai. 1999. "Identification of Functional Amino Acids in the Macrolide 2'-Phosphotransferase II." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(8):2063–65.
- 84) Thomas, Christopher M. i Kaare M. Nielsen. 2005. "Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 3(9):711–21.
- 85) Tian, Yingjie, Hui Yu, Zhanli Wang. 2019. "Distribution of Acquired Antibiotic Resistance Genes among Enterococcus Spp. Isolated from a Hospital in Baotou, China." *BMC Research Notes* 12(1):27.
- 86) Unemo, Magnus i Robert A. Nicholas. 2012. "Emergence of Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Untreatable Gonorrhoea." *Future Microbiology* 7(12):1401–22.
- 87) Varaldo, Pietro E., Maria Pia Montanari, Eleonora Giovanetti. 2009. "Genetic Elements Responsible for Erythromycin Resistance in Streptococci." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(2):343–53.
- 88) Vesić, Dušanka i Christopher J. Kristich. 2012. "MurAA Is Required for Intrinsic Cephalosporin Resistance of Enterococcus Faecalis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(5):2443–51.
- 89) Vimberg, Vladimir, Jakub Lenart, Jiri Janata, Gabriela Balikova Novotna. 2015. "ClpP-Independent Function of ClpX Interferes with Telithromycin Resistance Conferred by Msr(A) in Staphylococcus Aureus." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(6):3611–14.
- 90) Walsh, Christopher. 2003. *Antibiotics Actions, Origins*.
- 91) Wellington, Elizabeth M. H., Alistair B. A. Boxall, Paul Cross, Edward J. Feil, William H. Gaze, Peter M. Hawkey, Ashley S. Johnson-Rollings, Davey L. Jones, Nicholas M. Lee, Wilfred Otten, Christopher M. Thomas, A. Prysor Williams. 2013. "The Role of the Natural Environment in the Emergence of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria." *The Lancet Infectious Diseases* 13(2):155–65.
- 92) Wilson, Daniel N. 2016. "The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance." *MBio* 7(3).
- 93) Xing, Linlin, Hui Yu, Jingjing Qi, Pan Jiang, Bingqing Sun, Junsheng Cui, Changcan Ou, Weishan Chang, Qinghai Hu. 2015. "ErmF and EreD Are Responsible for Erythromycin

- Resistance in *Riemerella Anatipestifer*." *PLoS ONE* 10(6).
- 94) Xiong, Wenguang, Yongxue Sun, Tong Zhang, Xueyao Ding, Yafei Li, Mianzhi Wang, Zhenling Zeng. 2015. "Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China." *Microbial Ecology* 70(2):425–32.
- 95) Xu, Weihai, Gan Zhang, Xiangdong Li, Shichun Zou, Ping Li, Zhaohui Hu, Jun Li. 2007. "Occurrence and Elimination of Antibiotics at Four Sewage Treatment Plants in the Pearl River Delta (PRD), South China." *Water Research* 41(19):4526–34.
- 96) Yoneyama, Hiroshi i Ryoichi Katsumata. 2006. "Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70(5):1060–75.
- 97) Zhanel, G. G., M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, J. A. Karlowsky. 2001. "Review of Macrolides and Ketolides: Focus on Respiratory Tract Infections." *Drugs* 61(4):443–98.
- 98) Zhang, Ye, April Z. Gu, Tianyu Cen, Xiangyang Li, Miao He, Dan Li, Jianmin Chen. 2018. "Sub-Inhibitory Concentrations of Heavy Metals Facilitate the Horizontal Transfer of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Genes in Water Environment." *Environmental Pollution* 237:74–82.
- 99) Zhou, Zhen Chao, Wan Qiu Feng, Yue Han, Ji Zheng, Tao Chen, Yuan Yuan Wei, Michael Gillings, Yong Guan Zhu, Hong Chen. 2018. "Prevalence and Transmission of Antibiotic Resistance and Microbiota between Humans and Water Environments." *Environment International* 121:1155–61.
- 100) Zuckerman, Jerry M. 2004. "Macrolides and Ketolides: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin." *Infectious Disease Clinics of North America* 18(3):621–49.

