



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Jurić

**POJAVNOST I MOLEKULARNE
KARAKTERISTIKE IMUNOSNOG SUSTAVA
CRISPR-CAS IZOLATA BAKTERIJE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE OTPORNIH I
OSJETLJIVIH NA KARBAPENEME**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Jurić

**OCCURRENCE AND MOLECULAR
CHARACTERISTICS OF THE CRISPR-CAS
IMMUNE SYSTEM IN *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* ISOLATES RESISTANT AND
SUSCEPTIBLE TO CARBAPENEMS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen na Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju, prevenciju i kontrolu infekcija Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Mareković i komentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić-Baće u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Informacije o mentorici: prof. dr. sc. Ivana Mareković

Prof. dr. sc. Ivana Mareković, redoviti profesor, diplomirala je 1996. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku studija i pripravničkog staža, započela je specijalizaciju iz kliničke mikrobiologije na Klinici za plućne bolesti Jordanovac, Zagreb te položila specijalistički ispit 2005. godine. Magistrirala je 2004. godine a doktorirala 2008. godine. Od 2008. godine zaposlena je u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju, prevenciju i kontrolu infekcija Kliničkog bolničkog centra Zagreb gdje je od 2016. do 2021. godine obavljala dužnost predstojnika Kliničkog zavoda, a od 2021. godine je voditelj Odjela za bakteriologiju i parazitologiju. Glavni je mentor za specijalizante kliničke mikrobiologije u KBC Zagreb. Od 2010. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je 2021. godine izabrana u znanstveno-nastavno zvanje redovitog profesora Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju.

Predmet njenih istraživanja su bakterijski patogeni, osobito kao uzročnici sepse te infekcija kod imunokompromitiranih bolesnika. Od 2019. godine voditeljica je pet Sveučilišnih potpora istraživanjima. Sudjelovala je kao ekspert Europske komisije u recenziji projekata u okviru Horizon 2020 te kao procjenitelj u vrednovanju projektnih prijedloga Razvojnih istraživačkih potpora u sklopu Nacionalnog plana oporavka i otpornosti.

U posljednjih pet godina objavila je 30 radova te dva poglavlja u knjigama te je koautor Smjernica za uzimanje, obradu i interpretaciju rezultata hemokultura Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora. Predstavnik je Hrvatske u UEMS sekciji za medicinsku mikrobiologiju i član Radne grupe UEMS-a za europski specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije. Član je Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESCMID) te studijskih grupa unutar ESCMID-a. Sudjelovala je kao član organizacijskih i znanstvenih odbora kongresa i skupova.

Informacije o komentorici: prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće

Prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće diplomirala je 1997. godine Molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku studija zapošljava se na Zavodu za Molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu kao asistent-znanstveni novak. Magistrirala je 2000. godine, potom se usavršavala 9 mjeseci na Institutu za genetiku Sveučilišta u Nottinghamu (Ujedinjeno Kraljevstvo) te je doktorirala 2004. godine. Docent je postala 2008. godine iz područja prirodnih znanosti, polje biologija, znanstvena grana molekularna biologija i biokemija, a izvanredni profesor 2017. godine. Na preddiplomskom sveučilišnom studiju Molekularna biologija predaje obavezni kolegij „Molekularna genetika“, a kolegij „Molekularna biologija i biotehnologija“ na integriranom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju Biologija i kemija. Na doktorskom studiju Biologija je sunositeljica kolegija „Genetička rekombinacija i popravak DNA“.

Fokus njenih istraživanja su mehanizmi homologne rekombinacije i popravka DNA te obrane bakterija od napada virusima (sustav CRISPR-Cas). Bila je voditeljica dvije potpore Zaklade HAZU, pet potpora SUZ, jednog bilateralnog projekta od British Councila, i HRZZ projekta "Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*", od 2017. do 2021. godine. Trenutno je voditeljica HRZZ projekta "Koliko je CRISPR-Cas adaptacija prilagodljiva na uvjete okoliša? Utjecaj DNA helikaza" (2023-2027) i mentorica je dvama doktorandima.

Objavila je 30 znanstvenih radova i jedno poglavlje u knjizi. Dobitnica je nagrade "Željko Trgovčević" za 2003. godinu Hrvatskog genetičkog društva i Državne nagrade za znanost za znanstveno otkriće za 2018. godinu. Bila je voditeljica preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija Molekularna biologija i članica povjerenstva za provedbu upisa na diplomatske sveučilišne studije na Biološkom odsjeku PMF-a. Sudjelovala je u radu panela ZZ1 (znanosti o životu) pri HRZZ te je bila predsjednica Hrvatske udruge genetičkih inženjera (HUGI) od 2019. do 2021. godine i članica je Odbora za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama (GMO) od 2022. godine.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Mareković i komentorici prof. dr. sc. Ivani Ivančić-Baće na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da od njih neprestano učim. Također hvala na ogromnoj podršci koju su mi pružile tijekom izrade ovog rada te na strpljenju, izdvojenom vremenu i profesionalnim savjetima pomoću kojih sam stekla nova znanja i vještine, a ponajviše im hvala na tome što su svaki problem uspjele učiniti laganim korakom naprijed.

Hvala i mojoj ekipi u labosu (Marini, Meliti, Eli, Ivanu, Ani i Mandi) koja je imala razumijevanja i pružala mi podršku od početka do kraja izrade ovog rada.

Od srca se zahvaljujem i svim svojim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene i koji su me podržali kada je bilo teško, ponajviše Vujićki. Hvala i mojoj maloj obitelji i Marku koji su nesebično bili sve vrijeme uz mene te prolazili sa mnom lijepe i one manje lijepe trenutke u životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

Pojavnost i molekularne karakteristike imunostnog sustava CRISPR-Cas izolata bakterije *Klebsiella pneumoniae* otpornih i osjetljivih na karbapeneme

Ivana Jurić

Odjel za molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

SAŽETAK

Sustavi CRISPR-Cas pružaju stečenu imunost protiv pokretnih genetskih elemenata, uključujući plazmide koji nose gene otpornosti na antimikrobne lijekove. Sojevi *K. pneumoniae* otporni na karbapeneme predstavljaju značajnu javnozdravstvenu prijetnju zbog kašnjenja u liječenju i povećane smrtnosti. U ovom se istraživanju proučavao odnos između sustava CRISPR-Cas i višestruke otpornosti na lijekove kod kliničkih izolata *K. pneumoniae*. Prikupljeno je 400 izolata *K. pneumoniae* – 200 otpornih na karbapeneme i 200 osjetljivih na karbapeneme. Geni koji kodiraju za karbapenemaze (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}), ključni gen povezan sa sustavom CRISPR, *cas1*, domaćinski gen *rpoB* i lokusi CRISPR1-3 dokazani su metodom PCR. Metode PFGE, MLST i analiza razmaknica nakon sekvenciranja provedene su kako bi se utvrdila genetska srodnost izolata. Statistička analiza provedena je pomoću hi-kvadrat i Fisherovog egzaktnog testa. Sustavi CRISPR-Cas otkriveni su u 15.8 % izolata, pri čemu su u 93.3 % tih izolata pronađeni podtipovi I-E i I-E*. Identificirana su dva klonska kompleksa: ST14/15/101 (kod sojeva otpornih na karbapeneme) i ST35 (kod sojeva osjetljivih na karbapeneme). U izolatima otpornima na karbapeneme, gen *bla*_{OXA-48} bio je češći u sojevima bez sustava CRISPR-Cas, dok su geni *bla*_{NDM-1} i *bla*_{KPC-2} bili učestaliji kod sojeva sa sustavom CRISPR-Cas ($p < 0.0001$). Otpornost na imipenem + relebaktam bila je značajno viša u izolatima bez sustava CRISPR-Cas. Sustavi CRISPR-Cas kod sojeva *K. pneumoniae* u korelaciji su sa specifičnim profilima gena za karbapenemaze, što upućuje na selektivni pritisak protiv stjecanja gena *bla*_{OXA-48}. Korelacija između razmaknica lokusa CRISPR i dominantnih klonskih kompleksa poput ST14, ST15 i ST101 kod izolata otpornih na karbapeneme upućuje na to da bi lokusi CRISPR mogli biti vrijedan alat za subtipizaciju nakon metode MLST.

(143 stranice, 27 slika, 18 tablica, 210 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Klebsiella pneumoniae*, sustav CRISPR-Cas, lokusi CRISPR, podtipovi I-E i I-E*, geni koji kodiraju za karbapenemaze, otpornost na karbapeneme, antimikrobna otpornost, PFGE, MLST

Mentorica:

prof. dr. sc. Ivana Mareković

Komentorica:

prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće

Ocjenjivači:

prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

izv. prof. dr. sc. Nadira Duraković

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Occurrence and molecular characteristics of the CRISPR-Cas immune system in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant and susceptible to carbapenems

Ivana Jurić

Department of Molecular Microbiology, Clinical Hospital Center Zagreb

SUMMARY

CRISPR-Cas systems provide acquired immunity against mobile genetic elements, including plasmids that carry antimicrobial resistance genes. Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains represent a significant public health threat due to treatment delays and increased mortality. This study investigated the relationship between the CRISPR-Cas system and multidrug resistance in clinical *K. pneumoniae* isolates. A total of 400 *K. pneumoniae* isolates were collected – 200 carbapenem-resistant and 200 carbapenem-susceptible. Genes encoding for carbapenemases (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}), the key CRISPR-associated gene *cas1*, the housekeeping gene *rpoB*, and CRISPR1-3 loci were detected by PCR. PFGE, MLST, and post-sequencing spacer analysis were performed to determine the genetic relatedness of the isolates. Statistical analysis was conducted using the chi-square and Fisher's exact tests. CRISPR-Cas systems were detected in 15.8 % of isolates, with subtypes I-E and I-E* found in 93.3 % of these isolates. Two clonal complexes were identified: ST14/15/101 (in carbapenem-resistant strains) and ST35 (in carbapenem-susceptible strains). In carbapenem-resistant isolates, the *bla*_{OXA-48} gene was more common in strains without the CRISPR-Cas system, whereas the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} genes were more prevalent in strains with the CRISPR-Cas system ($p < 0.0001$). Resistance to imipenem + relebactam was significantly higher in isolates without the CRISPR-Cas system. CRISPR-Cas systems in *K. pneumoniae* strains correlate with specific carbapenemase gene profiles, suggesting a selective pressure against the acquisition of the *bla*_{OXA-48} gene. The correlation between CRISPR loci spacers and dominant clonal complexes, such as ST14, ST15, and ST101, in carbapenem-resistant isolates indicates that CRISPR loci could be a valuable tool for subtyping after MLST.

(143 pages, 27 figures, 18 tables, 210 references, original in: Croatian)

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, CRISPR-Cas system, CRISPR loci, subtypes I-E and I-E*, Carbapenemase Genes, Carbapenem resistance, Antimicrobial resistance, PFGE, MLST

Supervisor:

Professor Ivana Mareković

Co-supervisor:

Professor Ivana Ivančić-Baće

Reviewers:

Professor Mirjana Pavlica

Professor Tomislav Ivanković

Professor Nadira Duraković

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	4
2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Bakterijska vrsta <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.2. Razvoj beta-laktamskih antimikrobnih lijekova i pojava otpornosti na beta-laktame u enterobakterija – kratki povijesni pregled.....	10
2.3. Karbapenemi	13
2.4. Otpornost bakterije <i>K. pneumoniae</i> na karbapeneme.....	16
2.4.1. Otpornost na karbapeneme posredovana karbapenemazama	17
2.4.2. Otpornost na karbapeneme posredovana ostalim mehanizmima	21
2.4.3. Uloga plazmida u širenju otpornosti na karbapeneme	21
2.5. Otkriće i uloga sustava CRISPR-Cas	22
2.6. Klasifikacija, distribucija i primjena sustava CRISPR-Cas	25
2.7. Sustav CRISPR-Cas bakterije <i>K. pneumoniae</i> – raznolikost, organizacija i mehanizam djelovanja	28
2.8. Dosadašnja saznanja o povezanosti sustava CRISPR-Cas i otpornosti na antimikrobne lijekove kod sojeva <i>K. pneumoniae</i>	32
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1. Popis materijala.....	38
3.1.1. Kemikalije i reagensi.....	38
3.1.2. Antibiotici i inhibitori beta-laktamaza	38
3.1.3. Hranjive podloge i mediji.....	39
3.1.4. Boje korištene za vizualizaciju fragmenata DNA prilikom provođenja agarozne gel elektroforeze.....	40
3.1.5. Standardi molekulskih masa (markeri veličina).....	40
3.1.6. Proteini, enzimi i pripadajući reakcijski puferi	40
3.1.7. Komercijalne smjese reagensija – kompleti.....	41
3.1.8. Nukleinske kiseline	41
3.1.9. Puferi i otopine.....	43
3.1.10. Potrošni materijal	44

3.1.11. Uređaji	44
3.2. Izolati bakterije <i>K. pneumoniae</i>	45
3.3. Testiranje antimikrobne osjetljivosti izolata <i>K. pneumoniae</i> metodom disk difuzije	46
3.4. Testiranje antimikrobne osjetljivosti izolata <i>K. pneumoniae</i> metodom mikrodilucije u bujonu	47
3.5. Detekcija i karakterizacija gena koji kodiraju za karbapenemaze, sustava CRISPR-Cas i sedam domaćinskih gena izolata <i>K. pneumoniae</i>	48
3.5.1. Izolacija bakterijske DNA	48
3.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i agarozna gel elektroforeza	49
3.5.3. Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)	51
3.6. Molekularna epidemiologija	53
3.6.1. Gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (PFGE)	53
3.6.2. Tipizacija sljedova više lokusa (MLST) izolata <i>K. pneumoniae</i>	54
3.7. <i>String</i> test.....	55
3.8. Prikupljanje arhivskih podataka	56
3.9. Statistička analiza.....	56
4. REZULTATI.....	58
4.1. Izolati <i>K. pneumoniae</i> i kliničke karakteristike bolesnika	59
4.2. Antimikrobna osjetljivost izolata <i>K. pneumoniae</i>	60
4.3. Otpornost izolata na karbapeneme s obzirom na vrstu uzorka i kliničke karakteristike bolesnika.....	64
4.4. Distribucija gena <i>bla</i> koji kodiraju za karbapenemaze kod izolata <i>K. pneumoniae</i> i povezanost s otpornošću na karbapeneme	66
4.5. Distribucija sustava CRISPR-Cas kod izolata osjetljivih i otpornih na karbapeneme s obzirom na bolničke odjele, vrstu uzorka i kliničke karakteristike bolesnika.....	69
4.6. Korelacija između prisutnosti sustava CRISPR-Cas i antimikrobne otpornosti	72
4.7. Rezultati <i>string</i> testa.....	75
4.8. Molekularna epidemiologija	75
4.9. Polimorfizmi lokusa CRISPR i korelacija s otpornošću na karbapeneme, grupom ST i bolničkim odjelima.....	81
4.10. Podrijetlo razmaknica lokusa CRISPR	88
5. DISKUSIJA.....	92

6. ZAKLJUČAK	116
7. POPIS LITERATURE	119
ŽIVOTOPIS	143

1. UVOD

Klebsiella pneumoniae je vrsta Gram-negativnih bakterija reda Enterobacterales koja kolonizira probavni sustav ljudi, a klinički je dominantan oportunistički patogen koji uzrokuje širok raspon infekcija, uključujući pneumoniju, meningitis, infekcije krvotoka te infekcije mokraćnog sustava (Tang i sur., 2020.; Rocha i sur., 2022.). Otprilike trećina infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama u bolnicama pripisuje se sojevima *K. pneumoniae*, a genom ove bakterije je veličine ~ 5,5 mbp, s ~ 5500 gena, od čega je ~ 3500 gena pomoćnih, što upućuje na dinamičan i plastičan karakter ovog genoma (Martin i Bachman, 2018.). Zbog povećane učestalosti infekcija uzrokovanih enterobakterijama koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (eng. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL), u svrhu liječenja su se u velikoj mjeri počeli koristiti karbapenemi. Karbapenemi su beta-laktamski antimikrobni lijekovi širokog spektra djelovanja čija se djelotvornost temelji na vezanju i inhibiciji transpeptidaza PBP (eng. *Penicillin-Binding Protein*), dobrom prodiranju kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija i stabilnosti pri djelovanju beta-laktamaza. Česta upotreba karbapenema dovodi do pojave enterobakterija koje proizvode posebnu vrstu beta-laktamaza (karbapenemaze), koje hidroliziraju karbapeneme, što se najviše očituje u bolničkoj sredini (Sheu i sur., 2019.; Tang i sur., 2020.; Pu i sur. 2023.). Enterobakterije otporne na karbapeneme (eng. *carbapenem-resistant Enterobacterales*, CRE) predstavljaju javno-zdravstveni problem zbog ograničenog izbora djelotvornih antimikrobnih lijekova i posljedično povećane smrtnosti (Tacconelli i sur., 2018.). Naime, kod bolesnika, kod kojih su detektirani sojevi CRE, zabilježena je dva do tri puta viša stopa smrtnosti od bolesnika s infekcijama uzrokovanim patogenima osjetljivima na karbapeneme (Martin i sur., 2018.; CDC, 2019.). Ove enterobakterije su na vrhu popisu prioriteta Svjetske zdravstvene organizacije za istraživanje i razvoj novih antimikrobnih lijekova (Tacconelli i sur., 2018.).

Uzrok otpornosti na karbapeneme jesu mutacije u genomu i/ili izmjena genetskog materijala među bakterijama koja je uvelike olakšana zbog genskih informacija koje se nalaze na MGE-ovim (eng. *Mobile Genetic Elements*, MGEs), ponajviše plazmidima i transpozonima (Tambić Andrašević i sur., 2018.; Tambić Andrašević i sur., 2019.). Najučestalija karbapenemaza u enterobakterija iz klase A je KPC (eng. *K. pneumoniae Carbapenemase*), iz klase B su to enzimi NDM (eng. *New Delhi Metallo-β-lactamase*), VIM (eng. *Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase*) i IMP (eng. *Imipenemase*), dok su karbapenemaze OXA (eng. *Oxacillinase*) svrstane u klasu D (Sheu i sur., 2019.). OXA-48 je najzastupljenija karbapenemaza među bakterijskim izolatima *K. pneumoniae* otpornima na karbapeneme u Hrvatskoj (Bedenić i sur., 2018.; Tambić Andrašević i sur., 2019.). U Hrvatskoj se primarna otpornost sojeva *K. pneumoniae* na karbapeneme pripisuje prisutnosti gena *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2} i *bla*_{VIM-2} koji se najčešće šire horizontalnim prijenosom gena (eng. *horizontal gene transfer*, HGT) (Tambić Andrašević i sur., 2019.; Kuzina i sur., 2023.).

Unatoč potencijalnim prednostima HGT-a, u smislu prikupljanja korisnih gena, bakterije moraju uravnotežiti stjecanje korisnih osobina s izbjegavanjem štetnih genetskih elemenata koji bi mogli iscrpiti njihove zalihe energije ili biti letalni. Kako bi ograničile ulazak invazivnih genetskih elemenata, kao što su bakteriofagi i plazmidi, bakterije koriste obrambeni sustav CRISPR-Cas (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and their associated cas genes*) koji osigurava adaptivni imunitet sprječavanjem ulaska strane DNA i/ili RNA (Kamruzzaman i Iredell, 2020.). CRISPR-Cas je otkriven u oko 45 % bakterijskih genoma, a klasificiran je u dva razreda, šest tipova (I–VI) i 33 podtipa (Newire i sur., 2020.). Funkcionalni sustav CRISPR-Cas sastoji se od lokusa CRISPR, klastera pripadnih gena *cas* i vodeće sekvence. Lokusi CRISPR obično se sastoje od visoko konzerviranih ponavljajućih sekvenci (21-48 bp) pravilno odvojenih jedinstvenim razmaknicama (21-72 bp). Vodeća sekvenca nalazi se uzvodno od prve razmaknice i djeluje kao promotor za transkripciju lokusa CRISPR (Shen i sur., 2017.; Jwair i sur., 2023.). Broj gena *cas* može varirati od 4 do više od 20, a produkti tih gena, proteini Cas, osiguravaju enzimatski sklop potreban za stjecanje razmaknica kao i za prepoznavanje stranih genetskih elemenata (Ostria-Hernández i sur., 2015.). Put do imuniteta može se podijeliti u tri faze: prilagodba (adaptacija), ekspresija i sazrijevanje te interferencija (Xue i Sashital, 2019.). Tijekom prve faze cijepa se strana DNA na kratke fragmente - protorazmaknice. Proteini Cas prepoznaju kratke slijedove PAM (eng. *Protospacer Adjacent Motif*), i odabiru one protorazmaknice u blizini motiva PAM za ugradnju u lokus CRISPR. U drugoj fazi se stvara primarni transkript (pre-RNA) lokusa CRISPR (pre-crRNA) koji se procesira u kratke crRNA. Svaka crRNA sadrži prepisanu razmaknicu i dio 5' i 3' od ponavljajućeg slijeda. crRNA se spaja s efektorskim proteinima Cas kako bi formirala kompleks. Tijekom faze interferencije, novonastali kompleks pretražuje stanicu na temelju komplementarnog sparivanja baza u stranoj DNA sa slijedom crRNA. Ciljno vezanje pokreće nukleolitičko cijepanje i degradaciju ciljne nukleinske kiseline (Anders i sur., 2014.; Sternberg i sur., 2014.; Wang i sur., 2020.).

Ostria-Hernandez i suradnici su 2015. godine izvijestili da su sustavi CRISPR-Cas identificirani u 6 od 52 (11.5 %) genoma sojeva *K. pneumoniae* korištenjem alata CRISPRFinder, dok ih je ukupno 37 (54.4 %) pronađeno istim alatom među 68 genoma sojeva *Klebsiella* spp. preuzetih iz NCBI-jevih (eng. *National Center for Biotechnology Information*) baza podataka (Li i sur., 2018.). Tri različita podtipa (I-E, I-F i I-E*) sustava CRISPR-Cas tipa I otkrivena su u objavljenim genomima *Klebsiella* spp. Ovi podtipovi imaju različite karakteristike: protein Cas1 podtipa I-E* razlikuje se od podtipova I-E i I-F, sva tri sustava prepoznaju različite sekvence PAM i njihovi geni se nalaze na različitim položajima na bakterijskom kromosomu. Prema relativnom položaju na kromosomu, lokusi CRISPR su označeni od CRISPR1 do CRISPR5. Podtip I-E sadrži lokus CRISPR-1, dok podtip I-E* sadrži lokuse CRISPR2 i CRISPR3. Oba podtipa dijele svih osam gena *cas* s razlikom u relativnom

položaju gena *cas6* (Shen i sur., 2017.). U kliničkih izolata *K. pneumoniae* nedavno je otkriven i tip IV-A3 koji je specifično lociran na plazmidu IncHI1B/IncFIB. Tip IV se ranije nazivao nepoznati tip (tip U) zbog svoje rijetke pojave, no danas se pretpostavlja da je stekao sposobnost prilagodbe povezujući se s elementom sličnim transpozonu koji sadrži gene *cas1* i *cas2*, što ukazuje na to da ovaj sustav, kao i drugi sustavi tipa IV, ne mogu funkcionirati kao neovisni adaptivni imunološki sustavi (Newire i sur., 2020.; Makarova i sur., 2013.; Rath i sur., 2015.).

Prethodne studije ukazale su na to da sustav CRISPR-Cas utječe na virulenciju bakterija na različite načine. Kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* sustav modulira stvaranje biofilma, dok kod *Enterococcus faecalis* obrnuto korelira s otpornošću na antimikrobne lijekove. Osim toga, sustav CRISPR-Cas može utjecati na sadržaj profaga i virulenciju kod sojeva *Streptococcus pyogenes* (Wang i sur., 2020.). Međutim, sustavi CRISPR-Cas u bakterija *Salmonella* i *E. coli* nisu u potpunosti funkcionalni jer pokazuju ograničenu učinkovitost u blokiranju prijenosa plazmida i otpornosti na antibiotike (Shen i sur., 2017.; Wang i sur., 2020.). S druge strane, u kliničkim izolatima *K. pneumoniae* uočeno je da ovaj sustav nije jednoliko raspoređen među izolatima, već da je specifično povezan s određenim tipovima sekvenci (eng. *Sequence Type*, ST), što sugerira da bi mogao igrati ulogu u adaptaciji i virulenciji određenih sojeva *K. pneumoniae* (Wang i sur., 2020.; Li i sur., 2018.; Alkompoz i sur., 2023.). Nedavno je pokazano da izolati *K. pneumoniae* bez sustava CRISPR-Cas imaju bolju sposobnost stjecanja gena otpornosti na antimikrobne lijekove, uključujući gene koji kodiraju za karbapenemaze, ESBL-ove i enzime za modifikaciju aminoglikozida (eng. *aminoglycoside-modifying enzymes*, AMEs) (Wang i sur., 2020.; Liao i sur., 2020.; Jwair i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Unatoč tome, veza između sustava CRISPR-Cas i otpornosti na antimikrobne lijekove, specifično karbapeneme, u izolata *K. pneumoniae* ostaje nejasna. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti korelaciju sustava CRISPR-Cas i otpornosti na antimikrobne lijekove usporedbom pojavnosti podtipova I-E i I-E* sustava CRISPR-Cas I u izolatima bakterija *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme.

1.1. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Glavna svrha ovog rada bila je istražiti pojavnost i molekularne karakteristike imunološkog sustava CRISPR-Cas u izolata bakterije *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme (eng. *carbapenem-resistant*, CR) i osjetljivih na karbapeneme (eng. *carbapenem-susceptible*, CS) i njegovu povezanost s otpornosti na antimikrobne lijekove, s naglaskom na karbapeneme. Stoga su postavljeni sljedeći istraživački ciljevi:

- 1) Utvrditi i usporediti pojavnost sustava CRISPR-Cas kod izolata bakterije *K. pneumoniae* s obzirom na otpornost na ostale testirane antimikrobne lijekove.
- 2) Utvrditi pripadnost izolata određenoj grupi ST na temelju konstitutivnih gena domaćina i razmaknica lokusa CRISPR kako bi se istražilo je li došlo do njihovog klonalnog širenja.
- 3) Usporediti pojavnost sustava CRISPR-Cas, razmaknica u lokusu CRISPR i pripadnost grupi ST s kliničkim karakteristikama bolesnika (dob, dijabetes, hipertenzija, maligne bolesti, boravak u jedinici intenzivnog liječenja, mortalitet unutar 30 dana) i vrstom uzorka.

Ostvarivanje ovih ciljeva doprinijet će boljem razumijevanju i novim spoznajama o povezanosti sustava CRISPR-Cas i otpornosti bakterije *K. pneumoniae* na karbapeneme i ostale antimikrobne lijekove te će definirati moguću ulogu sustava CRISPR-Cas u distribuciji gena koji kodiraju za karbapenemaze, o čemu do sada nema podataka u Hrvatskoj. Također će se dobiti informacije o mogućnosti upotrebe ovog sustava kao dodatne metode za definiranje klonalnog širenja bakterija unutar odjela bolnica, budući da su do sada korištene prvenstveno metode genotipizacije i cjelogenomskog sekvenciranja. Naime, metode analize podudarnosti razmaknica, multilokusnog sekvenciranja i prisutnost gena *cas* moći će se primijeniti za daljnja istraživanje interakcije sustava CRISPR-Cas i antimikrobne otpornosti kod sojeva *K. pneumoniae*, ali i kod drugih kliničkih i okolišnih patogenih bakterija. Očekuje se da će ovi rezultati biti korisni prilikom budućih istraživanja o potencijalnoj primjeni endogenog sustava CRISPR-Cas u liječenju infekcija te sprečavanju širenja višestruko otpornih bakterijskih sojeva s obzirom na to da DNA nukleaza vođena s RNA može specifično cijepati bakterijsku DNA, čime bakterijske stanice otporne na antibiotike mogu ponovo postati osjetljive.

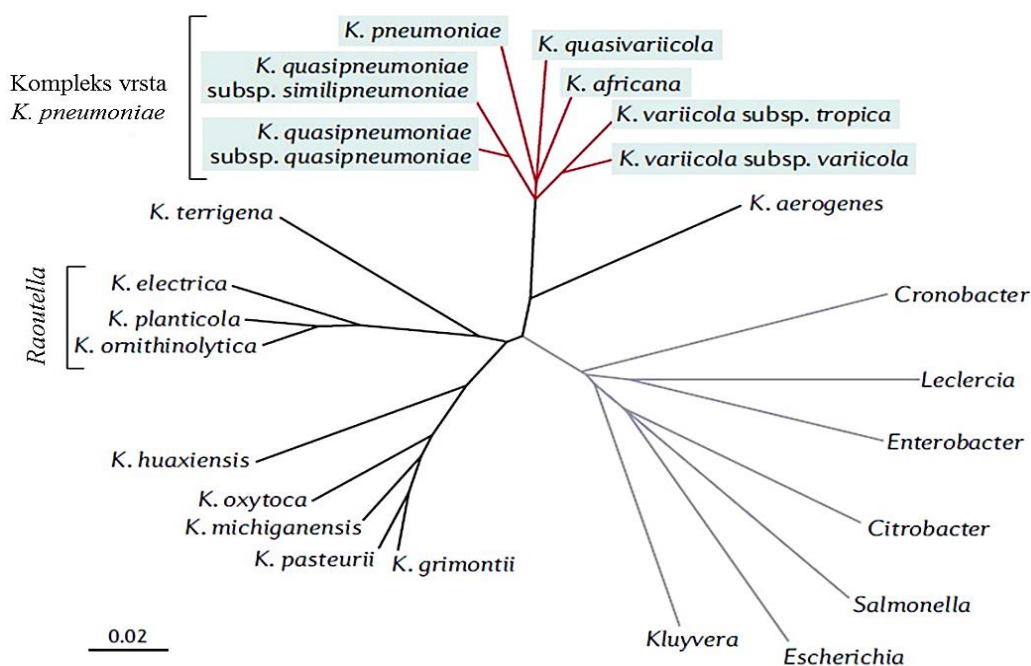
U skladu s prethodnim istraživanjima i definiranim ciljevima, postavljane su sljedeće hipoteze:

- 1) Prisutnost sustava CRISPR-Cas među izolatima bakterije *K. pneumoniae* se razlikuje ovisno o osjetljivosti na karbapeneme i vrsti karbapenemaze.
- 2) Sekvence lokusa CRISPR su različite u izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme.
- 3) Kod izolata bakterije *K. pneumoniae* postoji povezanost između pripadnosti pojedinim grupama ST i pojavnosti lokusa CRISPR.
- 4) Prisutnost sustava CRISPR-Cas razlikuje se ovisno o kliničkim karakteristikama bolesnika (dijabetes, hipertenzija, maligne bolesti, boravak u jedinici intenzivnog liječenja, smrtnost unutar 30 dana od prve izolacije iz kliničkog uzorka) i vrsti uzorka iz kojeg izolat *K. pneumoniae* potječe.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bakterijska vrsta *Klebsiella pneumoniae*

Bakteriju *K. pneumoniae* prvi je opisao Carl Friedländer 1882. godine, izoliravši je iz pluća pacijenata koji su umrli od upale pluća (Friedlaender, 1882.). Iako se u medicinskom kontekstu prvi put spominje kao Friedländer-ov bacil, nazvana je po Edwinu Klebsu, njemačkom mikrobiologu koji je ranije proučavao ovu bakteriju (Long i sur., 2017.a). Rod *Klebsiella* pripada porodici *Enterobacteriaceae*, redu *Enterobacterales*, razredu *Gammaproteobacteria* i koljenu *Proteobacteria*. Napretkom genetske analize članovi kompleksa vrsta *Klebsiella pneumoniae* (eng. *Klebsiella pneumoniae* species complex, KpSC) prvi su put razdvojeni na temelju sekvenci gena *gyrA* i označeni kao filogrupe *K. pneumoniae*, a kasnije i na temelju genomske analize više od 300 izolata *K. pneumoniae*, čiji rezultati podupiru podjelu na tri različite vrste (Brisse i Verhoef, 2001.; Holt i sur., 2015.). Sekvenciranjem cijelog genoma utvrdilo se da značajan udio sojeva identificiranih kao *K. pneumoniae* zapravo pripada blisko srodnim vrstama koje dijele od 95 do 96 % genoma. Ovo saznanje dovodi do identifikacije novih vrsta unutar kompleksa (Wyres i sur., 2020.). U vrijeme pisanja ove disertacije, KpSC uključuje sedam filogrupa prikazanih na slici 1. (Wyres i sur., 2020.; Dong i sur., 2022.).



Slika 1. Filogenetska analiza prikazuje odnose genoma bakterije *K. pneumoniae*, njezinih bliskih srodnika unutar kompleksa vrsta *K. pneumoniae* te drugih članova roda *Klebsiella* i reda *Enterobacterales*. Taksonomski položaj nekih vrsta unutar roda *Klebsiella*, poput *K. terrigena*, *K. planticola* i *K. ornithinolytica*, trenutno je predmet rasprave. Iako su ove vrste na temelju sekvenci gena *gyrB* dodijeljene rodu *Raoultella*, ova klasifikacija bi značila da je rod *Klebsiella* nemonofiletski. Preuzeto i prilagođeno prema radu Wyres i sur. (2020.).

Genom *K. pneumoniae* sadrži oko 5500 gena koji kodiraju za oko 30 000 proteina (Rocha i sur., 2022.; Holt i sur., 2015.). Većina genoma sastoji se od akcesornih (pomoćnih) gena koji mogu kodirati za čimbenike virulencije, enzime koji razgrađuju antibiotike i druge značajke koje pomažu bakteriji da se prilagodi različitim okruženjima (Rocha i sur., 2022.; Martin i Bachman, 2018.). Pomoćni geni se često stječu HGT-om između bakterijskih vrsta, što dokazuju brojni genomski otoci i MGE-ovi. Taksonomske i GC analize ukazuju na to da su pomoćni geni pronađeni i kod velikog broja drugih bakterijskih vrsta, najčešće drugih vrsta roda *Klebsiella* s kojima *K. pneumoniae* dijeli 90.0 % genoma, ali i kod drugih enterobakterija, kao i udaljenijih redova (Holt i sur., 2015.; Wyres i sur., 2020.).

Dinamična priroda genoma *K. pneumoniae* proizlazi i iz brojnih plazmida koje ova bakterija može nositi. Tako je istraživanje iz 2017. godine pokazalo da genom sojeva *K. pneumoniae* u prosjeku nosi 4.5 plazmida u studiji provedenoj na 1.777 sojeva *K. pneumoniae* koji proizvode enzime ESBL (Long i sur., 2017.b). *K. pneumoniae* se na temelju svog genoma može podijeliti na oportunističke, hipervirulentne i višestruko otporne skupine, ali se na temelju njega može razlikovati i od blisko srodnih vrsta - bakterija *Klebsiella variicola* i *Klebsiella quasipneumoniae*. Filogenetske analize temeljene na 1000-2000 ključnih ili zajedničkih kromosomskih gena pokazuju da se populacija *K. pneumoniae* sastoji od stotina loza koje se međusobno razlikuju za ~ 0.5 % nukleotidne divergencije (Martin i Bachman, 2018.; Holt i sur., 2015; Wyres i sur., 2020.).

Bakterija *K. pneumoniae* je štapičasta, kapsulirana nesporogena bakterija, a širine je od 0.3 do 2 µm i duljine od 0.6 do 6 µm. Na čvrstim podlogama stvara tipične mukoidne kolonije, a optimalno raste na temperaturi ljudskog tijela (37 °C). Kao fakultativni anaerob, ova bakterija pokazuje iznimnu otpornost na različite temperaturne uvjete, uspijevajući preživjeti u širokom rasponu od 12 °C do 42 °C (Abbas i sur. 2024.; Ochońska i Brzychczy-Włoch, 2024.). Sposobnost razgradnje glukoze, čak i na povišenim temperaturama, daje joj značajnu prednost u različitim okolišima, osiguravajući energiju potrebnu za stvaranje biofilma i prilagodbu na nepovoljne uvjete (Ochońska i Brzychczy-Włoch, 2024.). Takva metabolička fleksibilnost omogućuje bakteriji da dulje opstane u različitim staništima uključujući tlo, vodu, biljke, životinje i ljude te povećava njezinu sposobnost infekcije novih domaćina.

Infekcije uzrokovane sojevima *K. pneumoniae* mogu nastati endogeno, iz vlastitog rezervoara kolonizacije bolesnika, ili egzogeno, iz okoline ili prijenosom od drugih osoba (Martin i Bachman, 2018.). Bakterija *K. pneumoniae* klasificirana je kao endemski oportunistički patogen, a najčešće izaziva infekcije kod hospitaliziranih bolesnika ili osoba s

oslabljenim imunitetom, uzrokujući česte infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi poput pneumonije, infekcija mokraćnog sustava i bakterijemije, a prevalencija se razlikuje ovisno o dobi bolesnika i geografskom položaju (Martin i Bachman, 2018.; Wyres i sur., 2020.). Studije provedene u SAD-u, Australiji i Engleskoj pokazale su značajno veću prevalenciju crijevne kolonizacije s *K. pneumoniae* među osobama koje su nedavno bile hospitalizirane (oko 25 %) u usporedbi s općom populacijom (oko 5 %) (Wyres i sur., 2020.). U Europi je *K. pneumoniae* jedan od najčešćih uzročnika infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama, a u Sjedinjenim Američkim Državama zauzima treće mjesto, odmah nakon *Clostridioides difficile* i *Staphylococcus aureus* (Coppola i sur., 2022.; Magill i sur., 2014.). Pneumonija uzrokovana bakterijom *K. pneumoniae* predstavlja značajan problem u jedinicama intenzivne njege, gdje su česte pneumonije povezane sa strojnom ventilacijom (Martin i Bachman, 2018.). Infekcije mokraćnog sustava predstavljaju najčešću kliničku manifestaciju infekcija uzrokovanih sojevima *K. pneumoniae*, dok bakterijemija zauzima drugo mjesto među gram-negativnim bakterijama, odmah iza bakterije *E. coli* (Magill i sur., 2014.; Martin i Bachman, 2018.). Sposobnosti formiranja biofilma omogućuje *K. pneumoniae* da se bolje adherira na umjetne materijale i katetere što može dovesti do infekcija povezanih s medicinskim pomagalicama koje se često teško liječe (Martin i Bachman, 2018.).

Hipervirulentni sojevi, s druge strane, mogu inficirati i zdrave pojedince u zajednici, uzrokujući teške infekcije poput apscesa jetre i endoftalmitisa (Tang i sur., 2020.). Geni koji određuju hipervirulenciju *K. pneumoniae* često su smješteni na plazmidima poput pLVPK i pK2044 (Choby i sur., 2020.; Russo i sur., 2021.). Od ranije je poznato da čimbenici virulencije uključuju kapsulu, lipopolisaharide, siderofore i pile. Osim toga, nedavna istraživanja su opisala i ostale bitne čimbenike virulencije: korištenje alantoina, sustave za preuzimanje željeza, efluksne pumpe te sustav sekrecije tipa VI (Podschn i Ullmann, 1998.; Martin i Bachman, 2018.).

Enterobakterije su ključna komponenta crijevne mikrobiote te su često izložene djelovanju antibiotika. Posljedično, crijevni ekosustav predstavlja optimalno okruženje za selekciju i širenje antimikrobne otpornosti. Učestala primjena antibiotika stvara snažan selektivni pritisak koji pogoduje preživljavanju i proliferaciji otpornih sojeva koji mogu razviti vlastite mehanizme otpornosti ili steći gene otpornosti HGT-om od drugih, prirodno otpornih bakterija (Canton i sur., 2003.; Jelić, 2018.). Upravo kao rezultat selektivnog pritiska uzrokovanog širokom upotrebom karbapenema u svrhu liječenja infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode enzime ESBL, javlja se treća skupina koju čine epidemijski,

višestruko otporni sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemaze, što ih čini iznimno teškima za liječenje antimikrobnim lijekovima (Rabaan i sur., 2022.; Navon-Venezia i sur., 2017.). Višestruka otpornost odnosi se na neosjetljivost na najmanje jedan antimikrobni lijek iz najmanje tri različite skupine, a ako je bakterijska vrsta prirodno otporna na određeni antibiotik, isti se ne uključuje u definiciju višestruko otpornog fenotipa (Magiorakos i sur., 2012.; Schultsz i Geerlings, 2012.). Prema podacima Centara za kontrolu i prevenciju bolesti iz 2014. godine, vrste *Klebsiella* su bile odgovorne za oko 80 % svih infekcija uzrokovanih enterobakterijama otpornima na karbapeneme u Sjedinjenim Američkim Državama, čime su ove bakterije postale ozbiljna prijetnja javnom zdravlju (Martin i Bachman, 2018.). Karbapenemi su beta-laktamski antimikrobni lijekovi koji su se tradicionalno koristili za liječenje teških infekcija uzrokovanih sojevima *K. pneumoniae*, ali je u porastu otpornost na ovu klasu antibiotika (Karampatakis i sur., 2023.).

2.2. Razvoj beta-laktamskih antimikrobnih lijekova i pojava otpornosti na beta-laktame u enterobakterija – kratki povijesni pregled

1929. godine je Alexander Fleming primijetio je da gljivični kontaminant utječe na rast obližnjih bakterija. Pokazalo se da se radi o gljivici *Penicillium notatum*, a antibakterijska molekula koju je proizvela nazvana je penicilin (Fleming, 1929.). Već 1940. godine zabilježena je prva otpornost na penicilin kod soja *E. coli*. Ova otpornost je kasnije povezana s proizvodnjom kromosomske penicilinaze AmpC, odnosno enzimskim mehanizmom kojim se bakterija prirodno branila (Abraham and Chain, 1988.; Bush 2018.). Uvođenje penicilina 1940-ih u kliničku praksu predstavljalo je prekretnicu u borbi protiv bakterijskih infekcija. Svi penicilini temelje se na zajedničkoj molekulskoj strukturi koja uključuje tiazolidinski i beta-laktamski prsten, s varijabilnom postraničnom aminokiselinom (R skupina). Ovi antibiotici se tradicionalno proizvode fermentacijom sojeva plijesni roda *Penicillium*, a kao produkt se dobivaju prirodni derivati poput benzilpenicilina (penicilin G) i fenoksimetilpenicilina (penicilin V) (Strohl, 1997.; Bedenić, 2009.). Njegovim stavljanjem na tržište 1941. godine, prevalencija sojeva *Staphylococcus aureus* otpornih na penicilin porasla je već iduće godine (Hutchings i sur., 2019.). Modifikacije osnovne strukture penicilina dovele su do stvaranja novih generacija polusintetskih penicilina - aminopenicilina. Tako je razvoj ampicilina, meticilina i tikarcilina tijekom 1950-ih godina omogućio učinkovito liječenje širokog spektra patogena, uključujući i mnoge Gram-negativne bakterije (Rapp i Urban, 2012.; Jelić, 2018.).

Otkriće penicilinaza Temoniera-1 (TEM-1) i sulfihidril varijante 1 (SHV-1) u izolatima *E. coli* i *K. pneumoniae* sredinom 20. stoljeća, označilo je početak globalne epidemije

otpornosti na beta-laktamske antibiotike (Paterson i Bonomo, 2005.; Iovleva i Doi, 2017.). Gen *bla_{SHV-1}* bio je lokaliziran na konjugativnom plazmidu p453, što je omogućilo brzo širenje gena među bakterijskim populacijama, a SHV-1 je posljedično pokazao hidrolitičku aktivnost prema penicilinima i cefalosporinima prve generacije (Liakopoulos i sur., 2016.). Cefalosporini su izvorno izolirani iz gljiva *Cephalosporium acremonium*. Njihova temeljna struktura, 7-aminocefalosporanska kiselina, sadrži karakteristični beta-laktamski prsten. Na temelju vremena otkrića i spektra djelovanja, cefalosporini se klasificiraju u pet generacija (Lin i Kück, 2022.; Bui i sur., 2025.). Stoga širenje enzima TEM-1 i SHV-1 među različitim bakterijskim vrstama, uključujući primarno sojeve *E. coli* i *K. pneumoniae*, dovodi do uvođenja cefalosporina treće generacije u kliničku praksu 1980-ih. Cefalosporini su pokazivali izvrsnu učinkovitost protiv Gram-negativnih bakterija sve do pojave enterobakterija koje prirodno proizvode beta-laktamaze AmpC (Paterson i Bonomo, 2005.; Livermore, 2012.) U prirodnim uvjetima, gen koji kodira za beta-laktamazu AmpC se nalazi na bakterijskom kromosomu, a proizvodnja enzima AmpC je inducibilna u prisutnosti beta-laktama. Međutim, genetske mutacije mogu dovesti do njegove kontinuirane proizvodnje, a HGT-om su se ovi geni pojavili i na plazmidima što je rezultiralo visokom razinom otpornosti na cefalosporine treće generacije (Jacoby, 2009.). Za sojeve *K. pneumoniae* je danas poznato da je *bla_{SHV}* konstitutivni genomski marker povezan s intrinzičnom otpornošću na ampicilin, dok su TEM-1 i AmpC plazmidom posredovane beta-laktamaze koje rezultiraju otpornošću na gotovo sve peniciline (Martin i Bachman, 2018.; Jacoby, 2009.).

Mutacije u genima koji kodiraju beta-laktamaze TEM-1 i SHV-1 dovode do pojave beta-laktamaza proširenog spektra (eng. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBLs) (Paterson i Bonomo, 2005.). Današnji sojevi *K. pneumoniae* nose dvije kopije gena *bla_{SHV}*: kromosomsku varijantu gena i stečenu plazmidnu varijantu koja je pod kontrolom jakog promotora (transpozaze IS26) (Wyres i sur., 2020.). Početkom 21. stoljeća javljaju se novi tipovi enzima iz skupine ESBL - CTX-M, odnosno plazmidima kodirane cefotaksimaze. Za razliku od prethodno dominantnih enzima TEM i SHV, geni za CTX-M potječu s kromosoma bakterija roda *Kluyvera* (Zhao i Hu, 2013.). Danas je poznato najmanje 109 varijanti enzima CTX-M, a u Europi je najzastupljenija skupina jedan, preciznije enzim CTX-M-15 (Paterson i Bonomo, 2005.; Livermore, 2012.; Zhao i Hu, 2013.).

Uvođenje karbapenema imipenema u kliničku praksu 1985. godine predstavljalo je značajan napredak u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama koje proizvode enzime ESBL i AmpC (Grundmann i sur., 2010.). Meropenem je bio drugi karbapenem koji je dobio odobrenje Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug*

Administration, FDA) 1996. godine, dok je ertapenem dobio regulatorno odobrenje 2001. godine u SAD-u i 2002. godine u Europskoj uniji (Lister, 2007.; Shah i Isaacs, 2003.). Početkom 2000-ih incidencija enterobakterija s oslabljenom osjetljivošću na karbapeneme bila je zanemariva, s prvim zabilježenim slučajevima kod sojeva *K. pneumoniae* i roda *Enterobacter*. No zbog sve jačeg selektivnog pritiska uzrokovanog širokom uporabom karbapenema dolazi do pojave bakterija koje proizvode karbapenemaze (Grundmann i sur., 2010.; Iovleva i Doi, 2017.).

Prvi gen za karbapenemazu *bla*_{IMP-1} detektiran je i opisan na plazmidu izolata bakterije *P. aeruginosa* krajem 1980-ih godina, u Japanu (Watanabe i sur., 1991.), a 1991. godine je IMP-1 (eng. *Imipenemase*) identificirana i u bakterije *Serratia marcescens* (Osano i sur., 1994.). Karbapenemaza VIM-1 (eng. *Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase 1*), detektirana u izolatu *P. aeruginosa*, je prvi put opisana u Italiji 1997. godine, a gen *bla*_{VIM-2} je 1996. godine identificiran u Marseille-u, u južnoj Francuskoj (Poirel i sur., 2001.). Stoga se može reći da je kraj 1990-ih ujedno i početak ere globalnog širenja karbapenemaza. U Hrvatskoj se enterobakterije koje proizvode VIM-1 pojavljuju od 2007. godine, a prva bolnička epidemija opisana je kod izolata *Enterobacter cloacae* u KBC-u Split 2012. godine (Novak i sur., 2014.; Jelić, 2018.).

2001. godine, Sjedinjene Američke Države (SAD) izvijestile su o soju *K. pneumoniae* koji nosi gen *bla*_{KPC-1} za plazmidom kodiranu karbapenemazu, kasnije nazvanu karbapenemaza *K. pneumoniae* (eng. *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*, KPC), nakon čega se ovaj gen proširio diljem SAD-a, a potom i globalno. Prvi izolati bakterija otpornih na karbapeneme, koji nose gen *bla*_{KPC-2}, identificirani su 2007. godine u Kini, a od tada je prevalencija karbapenemaza KPC-2 značajno porasla (Cui i sur., 2019.). Prvi slučaj pojave gena *bla*_{KPC-2} zabilježen je u Hrvatskoj 2011. godine, a izoliran je iz soja *K. pneumoniae* ST37 (Bedenić i sur., 2012.; Jelić, 2018.).

Epidemija karbapenemaze OXA-48 kreće nakon što je ista prvi put identificirana u izolatu *K. pneumoniae* iz Turske 2001. godine. Skupina OXA-48 uključuje klasičnu OXA-48 i njene varijante, OXA-181 i OXA-23 (Cui i sur., 2019.). Bakterija *K. pneumoniae* koja proizvodi karbapenemazu OXA-48 pojavila se u Hrvatskoj 2012. godine (Jelić i sur., 2018.), a trenutno je ova karbapenemaza najzastupljenija u kliničkih izolata *K. pneumoniae* u Hrvatskoj (Bedenić i sur., 2018.). 2008. godine je u Indiji prvi put prijavljen izolat *K. pneumoniae* otporan na karbapeneme kod kojeg je detektiran gen *bla*_{NDM-1} (Yong i sur., 2009), nakon čega svjedočimo značajnom porastu incidencije bakterija koje proizvode karbapenemazu NDM u Europi. U Hrvatskoj je prvi slučaj izolata *K. pneumoniae* koji proizvodi NDM-1 zabilježen 2009. godine

(Mazzariol i sur., 2012.).

U posljednje vrijeme sve je češća pojava enterobakterija koje istodobno proizvode više različitih karbapenemaza. Tako su kod sojeva *K. pneumoniae* često istovremeno prisutni enzimi NDM-1 i IMP-4, a kod izolata *E. cloacae* i *Citrobacter freundii* se javlja kombinacija enzima KPC i NDM (Cui i sur., 2019.). Ekstremni primjeri su bakterijski izolati koji kodiraju za čak tri različite karbapenemaze. Tako je već opisan soj *Klebsiella oxytoca* koji proizvodi KPC-2, NDM-1 i IMP-4 te soj *C. freundii* koji kodira za karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48 (Wang i sur., 2017.; Biez i sur. 2022.). Pojava trostruke prisutnosti gena *bla* (*bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1} i *bla*_{OXA-48}) prvi put je opisana u Hrvatskoj 2024. godine kod dva izolata bakterije *Enterobacter hormaechei* (Bošnjak i sur., 2025.). Ovakvi nalazi ukazuju na sve veću složenost mehanizama otpornosti na karbapeneme, posebno kod enterobakterija.

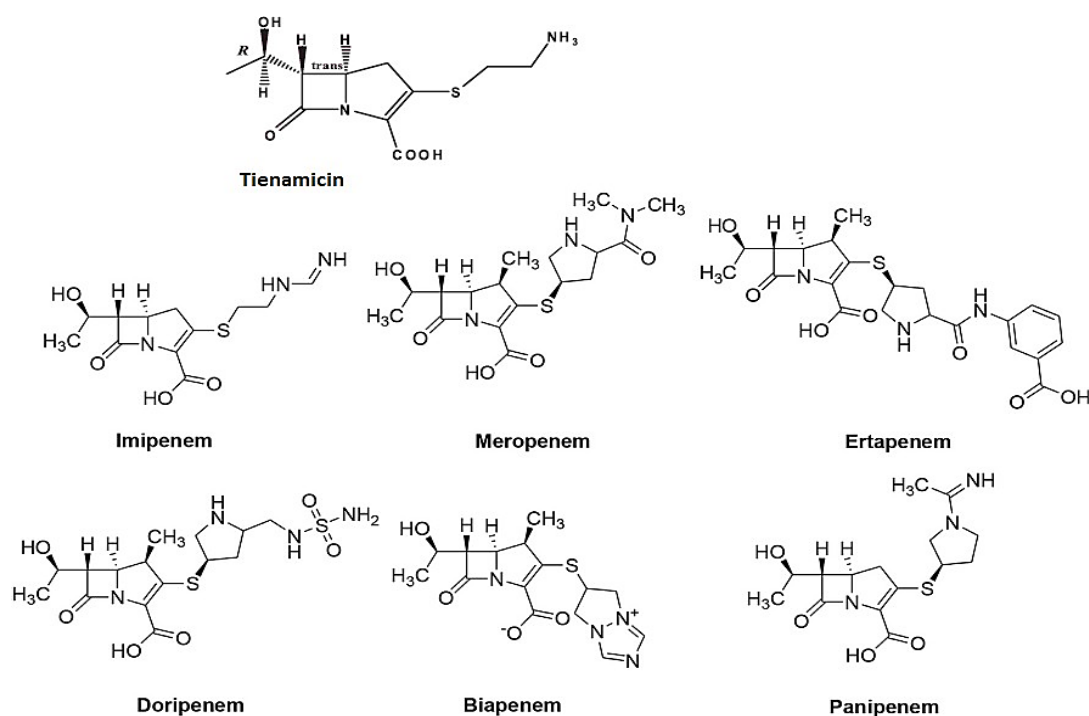
2.3. Karbapenemi

U beta-laktamske antimikrobne lijekove se danas ubrajaju penicilini, cefalosporini, monobaktami i karbapenemi, dok inhibitori beta-laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam, tazobaktam; te od novijih avibaktam, relebaktam i vaborbaktam) unatoč slaboj antibakterijskoj aktivnosti, igraju ključnu ulogu u sinergističkim kombinacijama (Cui i sur., 2019.). Karbapenemi predstavljaju esencijalnu skupinu beta-laktamskih antibiotika poznatih po svojoj potentnosti i djelotvornosti protiv širokog spektra Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a njihova klinička vrijednost posebno je naglašena u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko otpornim enterobakterijama, gdje se ističu kao antibiotici posljednjeg izbora (Nicolau, 2008.; Papp-Wallace i sur., 2011.).

Strukturno, karbapenemi se odlikuju karakterističnim beta-laktamskim prstenom spojenim s peteročlanim tiazolidinskim prstenom preko atoma dušika i ugljika, što osigurava stabilnost i otpornost na hidrolizu posredovanu beta-laktamazama, poput enzima ESBL i AmpC (El-Gamal i sur., 2017.; Papp-Wallace i sur., 2011.). Karbapenemi starije generacije uključuju imipenem, meropenem, biapenem, ertapenem i doripenem, a razlikuju se od penicilina po prisutnosti ugljikovog atoma umjesto sumpora na poziciji 1 u sekundarnom prstenu te dvostruke veze između C2 i C3 (Męcik i sur., 2024.). Hidroksietilna grupa na C6 i trans konfiguracija veze između C5 i C6 u beta-laktamskom prstenu također doprinose njihovoj otpornosti na hidrolizu (Papp-Wallace i sur., 2011.; Jelić, 2018.).

Raznolikost unutar skupine karbapenema proizlazi iz varijacija u strukturi bočnih lanaca, koji utječu na njihovu stabilnost, spektar djelovanja i farmakokinetička svojstva (Slika

2.) (Papp-Wallace i sur., 2011.; Jelić, 2018.). Međutim, struktura bočnih lanaca može uzrokovati i nestabilnost zbog čega je relativno mali broj karbapenema u kliničkoj upotrebi (Nicolau, 2008.). Tako se prvi otkriveni karbapenem (tienamicin), kojeg proizvodi bakterija *Streptomyces cattleya* iz tla, pokazao nestabilnim u vodenim otopinama i visoko reaktivan prema nukleofilima što je ograničilo njegovu stabilnost i potencijalnu kliničku primjenu (Kahan i sur., 1979.; Męcik i sur., 2024.). Njegov derivat imipenem se zbog osjetljivosti na bubrežnu dehidropeptidazu I (DHP-I) primjenjuje isto kao i panipenem, u kombinaciji s cilastatinom ili betamipronom, inhibitorima DHP-I. Kasnije su razvijeni i meropenem, ertapenem i doripenem koji su otporniji na DHP-I zbog metilne skupine na C1, imaju širi spektar djelovanja dodatkom pirolidinske skupine na C2, a R konfiguracija na C8 povećava njihovu potentnost (Nicolau, 2008.; Papp-Wallace i sur., 2011.; Jelić, 2018.).



Slika 2. Kemijska struktura karbapenemskih antibiotika. Preuzeto i prilagođeno prema radu Jelić (2018.).

Imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem su karbapenemi odobreni od strane Europske agencije za lijekove te se koriste u kliničkoj primjeni za liječenje intraabdominalnih i urinarnih infekcija, infekcija krvotoka i kože, vanbolničke i bolničke pneumonije te meningitisa (Shah, 2008.; Huang, 2022.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Panipenem i biapenem su prvotno odobreni u Japanu, a biapenem je naknadno odobren i u Indiji, Kini i na Tajlandu (Shah, 2008.; Bakthavatchalam i sur., 2024.)

Ertapenem je učinkovit protiv mnogih enterobakterija, ali ima ograničenu primjenu zbog nedostatka aktivnosti protiv sojeva roda *Pseudomonas* i *Acinetobacter* pa se najčešće koristi za liječenje vanbolničkih infekcija. Suprotno tome, imipenem, meropenem i doripenem su djelotvorni protiv nefermentirajućih Gram-negativne bakterija i otporniji su na hidrolizu (Shah i Isaacs, 2003.; Męcik i sur., 2024.). Također, imipenem zahtijeva kombinaciju s cilastatinom pa se ne primjenjuje kod neuroloških bolesnika, i to specifično u liječenju meningitisa (Zhanel i sur., 1998.). Meropenem je stabilan i ne zahtijeva dodatne lijekove, a zbog svog širokog spektra djelovanja, najčešće se koristi za liječenje teških infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama, uključujući enterobakterije, *P. aeruginosa* i *Haemophilus influenzae* (Edwards, 1995.). Doripenem ima nižu minimalnu inhibitornu vrijednost nego imipenem i meropenem u usporedbi s *P. aeruginosa* i *A. baumannii* te je karbapenem s najmanjom osjetljivošću na hidrolizu karbapenemazama (Męcik i sur., 2024.). Zbog sve složenijih mehanizama otpornosti, u posljednjih 10 godina, razvijale su se nove terapijske strategije. One uključuju kombinacije ceftolozan-tazobaktama, ceftazidim-avibaktama, aztreonam-avibaktama, imipenem-relebaktama i meropenem-vaboraktama, kao i primjenu plazomicina, eravaciklina i cefiderokola (Karampatakis i sur., 2023.; Cui i sur., 2019.). Tako je primjerice cefiderokol inovativni cefalosporin s izraženim afinitetom prema PBP-u 1a kod *P. aeruginosa* i PBP-u 2 kod *K. pneumoniae*, što mu omogućava visoku aktivnost protiv širokog spektra aerobnih Gram-negativnih bakterija, uključujući i one otporne na karbapeneme i kolistin (Silva i sur., 2021.).

Mehanizam djelovanja karbapenema temelji se na inhibiciji peptidazne domene PBP-ova. Vezanjem za PBP-ove, karbapenemi blokiraju umrežavanje peptida, odnosno inhibiraju sintezu peptidoglikana stanične stijenke što dovodi do poremećaja u rastu i diobi bakterija te konačno do njihove lize. Karbapenemi se vežu za različite PBP-ove s različitim afinitetima što objašnjava varijabilan spektar djelotvornosti pojedinih karbapenema. Meropenem pokazuje visok afinitet vezanja prema PBP-ovima 2, 3 i 4, imipenem prema PBP-ovima 1a, 1b i PBP-u 2 dok ertapenem kod *E. coli* veže PBP-ove 1a, 1b, 2, 3, 4 i 5, a preferencijalno PBP-ove 2 i 3 (Shah i Isaacs, 2003.; Nicolau, 2008.; Jelić, 2018.). Djelotvornost karbapenema se temelji na dobrom prodiranju kroz porinske kanale vanjske membrane Gram-negativnih bakterija, visokom afinitetu vezanja za PBP-ove i stabilnosti pri djelovanju beta-laktamaza (Papp-Wallace i sur., 2011.)

Spomenuti karbapenemi se primjenjuju parenteralno zbog slabe apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta, a izlučuju se putem bubrežne glomerularne filtracije (Papp-Wallace

i sur., 2011.). Tebipenem-PI-HBr je potencijalni oralni prolijevak karbapenema tebipenema koji je u fazi ispitivanja kao moguće rješenje za liječenje kompliciranih infekcija urinarnog trakta (Cotroneo i sur., 2020.). Uz tebipenem, u karbapeneme nove generacije se svrstavaju i razupenem, tomopenem i sanfetrinem (Męcik i sur., 2024.). Sigurnosni profil karbapenema je sličan ostalim beta-laktamima - uzrokuju nefrotoksičnost, neurotoksičnost i imunomodulaciju. Stoga se pri primjeni bilo kojeg karbapenema moraju uzeti u obzir predisponirajući čimbenici, s najčešćim nuspojavama poput proljeva i mučnine (Papp-Wallace i sur., 2011.; El-Gamal i sur., 2017.; Jelić, 2018.).

2.4. Otpornost bakterije *K. pneumoniae* na karbapeneme

Kako je prethodno navedeno, bakterije otporne na karbapeneme prvi put su opisane 90-ih godina prošlog stoljeća, nakon identifikacije soja *K. pneumoniae* koji proizvodi karbapenemaze (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Od tada se bilježi značajan porast infekcija uzrokovanih ovim bakterijama, osobito unutar roda Enterobacterales (Coppola i sur., 2022.). Kolonizacija s *K. pneumoniae* povezana je s kasnijom pojavom infekcija u hospitaliziranih bolesnika gdje glavnu ulogu imaju pomoćni geni bakterije, a HGT takvih gena među bakterijama odvija se putem transformacije, transdukcije i konjugacije. Osim toga, transpozoni su specijalizirani fragmenti DNA koji se ne repliciraju samostalno, ali često prenose gene otpornosti migracijom s kromosoma na plazmide. Suprotno tome, integroni, iako nepokretni, doprinose kodiranju gena otpornosti mehanizmima hvatanja i ekscizije gena (Martin i Bachman, 2018.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

U Europi je 2017. godine zabilježeno preko 30 000 invazivnih izolata *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme, dok je 2019. godine 43 % zemalja prijavilo regionalno ili međuregionalno širenje enterobakterija otpornih na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Resistant Enterobacterales*, CRE) (Coppola i sur., 2022.). U Sjedinjenim Američkim Državama sojevi CRE su prouzročili 1100 smrtnih slučajeva te više od 13 000 infekcija. Ovakve infekcije predstavljaju poseban rizik za bolesnike s invazivnim medicinskim pomagalima, dugotrajnom antibiotskom terapijom i imunokompromitiranim stanjima (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

Sojevi CRE se definiraju se kao sojevi otporni na barem jedan karbapenem prema njihovom fenotipskom profilu osjetljivosti na antimikrobne lijekove. Otpornost na karbapeneme može nastati različitim mehanizmima: (1) aktivacija efluksnih pumpi koje uklanjaju antibiotike i reguliraju unutarstanično okruženje; (2) smanjenje ili gubitak specifičnih

vanjskih membranskih porina čime se onemogućava ulazak karbapenema na mjesto djelovanja; (3) strukturne modifikacije PBP-a; (4) stjecanje karbapenemaza i beta-laktamaza, koje hidroliziraju karbapeneme i ostale beta-laktamske antibiotike (Coppola i sur., 2022.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Ipak, najčešći oblik otpornosti je proizvodnja karbapenemaza koja je zabilježena kod 85 % CRE diljem svijeta. Terminologija koja se koristi u tom slučaju je CPE (eng. *Carbapenemase-Producing Enterobacterales*), a označava specifičan mehanizam otpornosti temeljen na proizvodnji karbapenemaza. S obzirom na interpretaciju graničnih vrijednosti (eng. *clinical breakpoints*), nisu svi sojevi CPE otporni na karbapeneme, što ih čini teškima za otkrivanje samo jednom metodom laboratorijskog probira (Coppola i sur., 2022.; Patel i sur., 2020.). Dodatno, strukturne mutacije mogu inducirati ekspresiju beta-laktamaza s nižom karbapenemaznom aktivnošću (npr. AmpC, ESBL i CMX-M) što rezultira i nižom razinom otpornosti na karbapeneme (Rabaan i sur., 2022.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

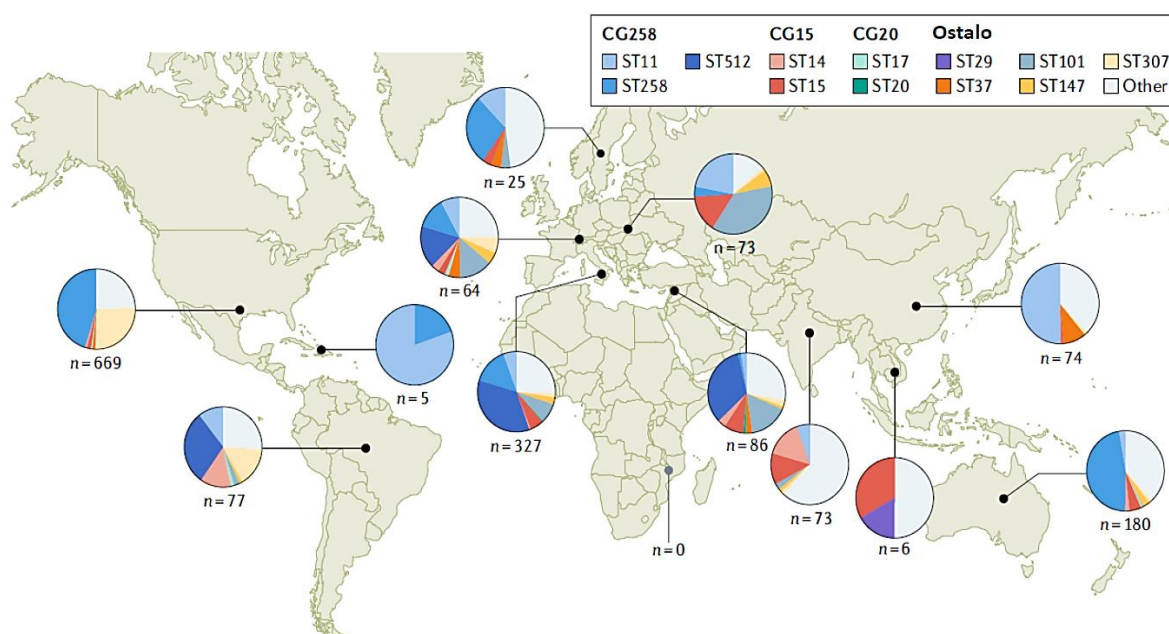
2.4.1. Otpornost na karbapeneme posredovana karbapenemazama

Karbapenemaze karakterizira široki spektar hidrolitičke aktivnosti koji obuhvaća većinu beta-laktamskih antibiotika. Za razliku od enzima ESBL, karbapenemaze su otporne na inhibiciju klasičnim inhibitorima beta-laktamaza, što ih čini posebno problematičnima u kliničkoj praksi (Queenan i Bush, 2007.). Uz to, geni *bla*_{ESBL} se najčešće šire HGT-om među različitim vrstama bakterija, dok je širenje karbapenemaznih gena *bla* češće povezano s klonskom ekspanzijom bakterijskih sojeva, kao što je to slučaj s izolatima *K. pneumoniae* ST258 koji proizvode karbapenemaze KPC (Wyres i sur., 2020.).

S obzirom na navedeno, važno je razlikovati pojmove izolat, soj i klon. Izolat predstavlja čistu bakterijsku kulturu dobivenu iz kliničkog uzorka, kod koje su poznati rod i vrsta, dok ostale karakteristike ostaju često neodređene. Izolati mogu biti pojedinačni predstavnici određenog soja, pri čemu pojam soj označava skupinu bakterija iste vrste sličnih fenotipskih i genotipskih osobina, dok se pojam klon obično koristi za opisivanje izolata koji, unatoč različitim geografskim lokacijama, vremenskim razdobljima izolacije ili izvorima uzoraka, dijele vrlo slične fenotipske i genotipske osobine, ukazujući na zajedničko porijeklo. Pojam bakterijski klon odnosi se na potomstvo nastalo binarnom diobom jedne bakterijske stanice, pri čemu ga čine genetski povezani izolati koji potječu od istog zajedničkog pretka (Jelić, 2018.).

Soj ST258 i njegov derivat ST512 najzastupljeniji su klonovi *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme u Americi i južnoj Europi, dok je njihova prisutnost u drugim dijelovima svijeta je znatno rjeđa. Suprotno tome, sojevi ST11, koji čini oko 12 % izolata u Europi, šire se

geografski i vodeći su uzročnik infekcija u Kini. Iako su klonalne linije poput ST11, ST15, ST101 i ST258/ST512 glavni pokretači širenja sojeva *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme (Slika 3.), lokalni epidemiološki čimbenici i karakteristike zdravstvenih ustanova također znatno oblikuju epidemiološki obrazac (Wyres i sur., 2020.).



Slika 3. Geografska distribucija i regionalne učestalosti sekvencijskih tipova (ST-ova) i klonalne grupe (eng. *Clonal Group*, CG) u koju analizirani sojevi *K. pneumoniae* otporni na karbapeneme spadaju. Preuzeto i prilagođeno prema radu Wyres i sur. (2020.).

Osim toga, važno je naglasiti i da sojevi *K. pneumoniae*, čija otpornost nije povezana s karbapenemazama, već sa smanjenom propusnošću stanične membrane, narušava njihovu kompetentnost, dovodeći do rijetke i nasumične pojave otpornih izolata, ograničene klonalne distribucije, kao i velike genetske heterogenosti bez dominantnih klonova. Suprotno tome, karbapenemazama posredovana otpornost, zahtijeva manje metaboličkih resursa što dovodi do pojave visoko adaptiranih klonovima s plazmidima koji nose gene za karbapenemaze. Ovakav ishod potom rezultira sinergijskom prednošću, odnosno pojavom višestruko otpornih fenotipova *K. pneumoniae* s ograničenim terapijskim opcijama (Jelić, 2018.; Nordmann i sur., 2011.). Također, razina otpornosti na karbapeneme može varirati i ovisno o vrsti karbapenemaze. Tako izolati koji proizvode karbapenemazu OXA-48 često pokazuju nižu razinu otpornosti na karbapeneme u usporedbi s izolatima koji proizvode karbapenemaze KPC (Narayanan i sur., 2016.; Jelić, 2018.). Ova varijabilnost može biti posljedica različitih čimbenika, uključujući razinu ekspresije enzima, prisutnost drugih mehanizama otpornosti i specifične interakcije između enzima i antibiotika.

2.4.1.1. Klasifikacija karbapenemaza

Prve opisane karbapenemaze su metalo-enzimi, karakterizirani prisutnošću cinka u aktivnom mjestu i osjetljivošću na kelatore, poput EDTA. Međutim, otkriće serinskih karbapenemaza u enterobakterija, koje su otporne na EDTA, ali ih inhibiraju klavulanska kiselina i tazobaktam, proširilo je spektar djelovanja ovih enzima. Prekretnica u razumijevanju karbapenemaza je pak obilježena sredinom 1990-ih, prijelazom od kromosomski kodiranih enzima, specifičnih za pojedinu vrstu bakterije, prema pokretnim, plazmidno kodiranim varijantama kao što su IMP-1, OXA-23 i KPC-1. Širenje ovih plazmida među različitim bakterijskim vrstama dovelo je do značajne promjene u epidemiologiji otpornosti na karbapeneme, pretvarajući lokalne probleme u globalnu prijetnju (Queenan i Bush, 2007.).

1995. godine Bush, Jacoby i Medeiros revidirali su funkcionalnu klasifikaciju beta-laktamaza koja ih dijeli u četiri skupine na temelju genetskog podrijetla beta-laktamaza (kromosomalno ili plazmidno), hidrolitičkog spektra beta-laktamaza, osjetljivosti na inhibitore, izoelektrične točke i molekularne težine (Samaha-Kfoury i Araj 2003.). Iako je funkcionalna podjela preciznija, prva i najzastupljenija klasifikacija je ona Amblerova, koja datira još iz 1980-ih, na osnovu slijeda nukleotida i pripadnih aminokiselina, koja svrstava ove enzime u četiri skupine (A, B, C i D), s tim da su skupine A, C i D serinske proteaze drugačijeg evolucijskog podrijetla (Ambler, 1980.; Ambler i sur., 1991.).

Skupina A obuhvaća serinske hidrolaze s molekularnom masom od ~ 29 kDa, karakterizirane visokom afinitetom prema penicilinskim spojevima. Među njima se ističu penicilinaza *Staphylococcus aureus* i dominantni predstavnici enzima ESBL (Ambler, 1980.; Ambler i sur., 1991.). Skupinu B čine metalo-enzimi ovisni o cinkovim ionima kao kofaktorima koji preferentno djeluju na cefalosporinske supstrate. U skupinu C svrstane su serinske cefalosporinaze čija su strukturno-enzimatska svojstva prvobitno dokumentirana u seminalnom radu iz 1981. godine (Jaurin i Grundström, 1981.). Konačno, klasa D predstavlja skupinu oksacilinaza s jedinstvenim katalitičkim profilom, sistematiziranu kao zasebnu filogenetsku granu krajem 1980-ih, što je potvrđeno i kasnijim istraživanjima (Bush i sur., 1995.).

Geni koji kodiraju za karbapenemaze se najčešće nalaze na MGE-ovim stoga je širenje takvih gena ubrzano, složeno i nepredvidivo (Nordmann i Poirel 2002.). Enzimi iz skupine A hidroliziraju karbapeneme, cefalosporine, peniciline i aztreonam. Iako su neki članovi ove skupine kodirani kromosomski, najveću kliničku važnost imaju plazmidno kodirani enzimi IMI (eng. *Imipenem-hydrolyzing beta-lactamase*), GES (eng. *Guiana Extended Spectrum*), i KPC

kao najprevalentniji uzročnici epidemije u mnogim europskim, sjevernoameričkim, azijskim i afričkim zemljama (Taggar i sur., 2020.; Codjoe i Donkor, 2017.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Gen *bla_{KPC}* uglavnom se nalazi unutar pokretnog transpozona Tn4401 duljine 10 kb, često prisutnog na konjugativnim plazmidima, što olakšava intraspecijski prijenos i širenje ovog gena. Od ukupno 84 verzije alela, karbapenemaze KPC-2 i KPC-3 su najrasprostranjenije (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

Metalo-beta-laktamaze (MBL) iz klase B karakterizira sposobnost razgradnje svih beta-laktamskih spojeva, osim monobaktama, što ih čini posebnim izazovom u odabiru antimikrobne terapije. Među 10 poznatih tipova MBL-a, klinički su najznačajnije karbapenemaze NDM, VIM i IMP (eng. *Imipenemase*) (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Geni koji kodiraju ove enzime se nalaze na integronima, a insercijom u plazmide ili transpozone se omogućava njihovo brzo širenje (Thomson, 2010.). Dok su geni *bla_{IMP}* i *bla_{VIM}* uglavnom povezani s genskim kazetama integrona iz skupine 1 i 3, najčešće ugrađenima u transpozone, gen *bla_{NDM}* se najčešće nalazi na plazmidima. Bakterije koje proizvode NDM često posjeduju i genetske klastere za sustav sekrecije tipa IV (T4SS), što dodatno povećava njihovu virulenciju (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

Klasa D obuhvaća preko 200 enzimskih varijanti s primarnom sposobnošću hidrolize oksacilina. OXA-48 i OXA-181 predstavljaju najdominantnije karbapenemaze unutar više od 40 poznatih tipova, a endemične su za sojeve *K. pneumoniae* u Turskoj, mediteranskim zemljama, Bliskom istoku, Sjevernoj Africi i Europi, uz značajan epidemiološki utjecaj (Berger i sur., 2013.; Boyd i sur., 2022.). Zanimljivo je da sojevi *K. pneumoniae* koji ekspiriraju oksacilinaze često pokazuju nisku razinu otpornosti na antibiotike zbog slabe ekspresije gena, što komplicira dijagnostičku detekciju i odgovarajuću terapijsku intervenciju (Boyd i sur., 2022.). Najučestalije karbapenemaze u patogenih sojeva *K. pneumoniae* su KPC, NDM i OXA-48 (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.; Sheu i sur., 2019.). Nedavno su nove kombinacije s inhibitorima beta-laktamaza stvorile dodatne terapijske mogućnosti za infekcije uzrokovane sojevima CRE. Međutim, novi inhibitori beta-laktamaza ne djeluju protiv svih karbapenemaza. Tako avibaktam inhibira KPC iz klase A i OXA-48 iz klase D, dok vaborbaktam i relebaktam inhibiraju samo KPC iz klase A. Supstrati hidrolize karbapenemaza KPC su svi beta-laktami, NDM hidrolizira sve beta-laktame osim aztreonama, a OXA-48 specifično razgrađuje peniciline i karbapeneme (Sheu i sur., 2019.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.).

2.4.2. Otpornost na karbapeneme posredovana ostalim mehanizmima

Jedan od ključnih sporednih mehanizama otpornosti, posredovan genima na bakterijskom kromosomu, uključuje promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine efluksnih pumpi, poput OqxAB i AcrAB, koje aktivno izbacuju antibiotike iz bakterijske stanice. Ove promjene su često posljedica mutacija u regulatornim genima poput *ramA* (utječe na obje efluksne pumpe), *rarA* (utječe na OqxAB) i *soxS* (utječe na AcrAB) (Wyres i sur., 2020.). Najbolje proučeni sustav efluksnih pumpi u sojeva *K. pneumoniae* je tripartitni kompleks AcrAB-TolC koji omogućuje izbacivanje raznovidnih toksičnih spojeva, uključujući antibiotike, doprinoseći razvoju višestruke otpornosti (Padilla i sur., 2010.; Masi i sur., 2019.; Jang, 2023.).

Vanjska membrana Gram-negativnih bakterija sadrži specijalizirane transmembranske proteine, kao što su porini, koji su zaduženi za nespecifičnu difuziju hidrofilnih spojeva (Martinez-Martinez, 2008.). Promjene u strukturi i funkciji porina, kao što su gubitak ili inaktivacija OmpK35 i OmpK36 kod *K. pneumoniae*, značajno smanjuju propusnost za antimikrobne spojeve. Ti defekti, osobito u kombinaciji s proizvodnjom karbapenemaza, sinergijski povećavaju otpornost na karbapeneme tako što, primjerice, prilikom proizvodnje beta-laktamaze OXA-48 su defekti porina ključni za postizanje klinički relevantne razine otpornosti (Wyres i sur., 2020.). Mutacije u PBP-ima dodatno doprinose otpornosti na karbapeneme, no njihov utjecaj je relativno ograničen u usporedbi s drugim mehanizmima (Logan i Weinstein, 2017.; Jelić, 2018.).

2.4.3. Uloga plazmida u širenju otpornosti na karbapeneme

Plazmidi su samoreplicirajuće molekule DNA koje igraju ključnu ulogu u prijenosu gena povezanih s antimikrobnom otpornošću i virulencijom među bakterijama. Plazmidi mogu nositi gene otpornosti na različite klase antibiotika (beta-laktame, aminoglikozide, tetracikline, kloramfenikol, sulfonamide, trimetoprim, makrolide i kinolone) zbog mogućnosti HGT-a istih i prisutnosti različitih MGE-ova - transpozona i insercijskih sekvenci (Carattoli, 2013.; Jelić, 2018.). Kod sojeva *K. pneumoniae*, većina gena otpornosti nalazi se na velikim konjugativnim plazmidima koji su tipizacijom replikona svrstani u iste skupine inkompatibilnosti (IncFII, IncN, IncR, IncX3) što podrazumijeva da su plazmidi s istim replikomom (konzerviranom regijom DNA neophodnom za replikaciju) inkompatibilni (Novick, 1987.; Carattoli, 2013.; Wyres i sur., 2020.). Analiza distribucije 19 najčešćih markera replikona, među 14 najučestalijih klonova *K. pneumoniae*, pokazala je da su replikoni FIB_K, FII_K i R

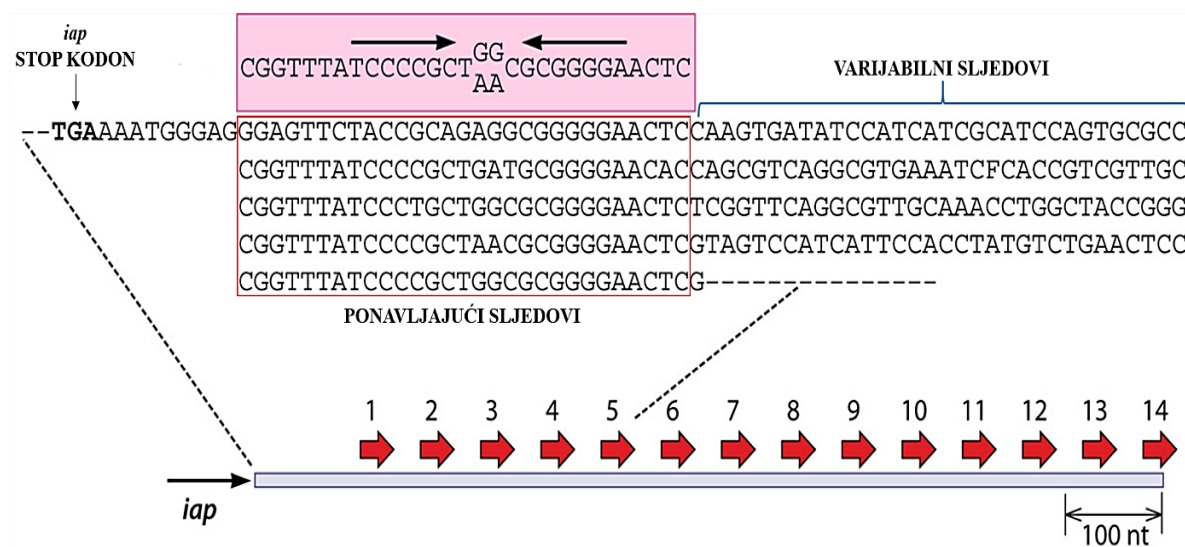
najzastupljeniji među višestruko otpornim plazmidima, dok su mali plazmidi (Col), određene varijante F plazmida (FII, FIA and FIB) i inkompatibilni tipovi X3, N, HI1B i AC/2, također česti (Wyres i sur., 2020.).

Unatoč varijacijama unutar istog klona, određeni plazmidi ostali su stabilni tijekom desetljeća evolucije. Primjerice, klon ST258 nosi plazmid pKpQIL s identificiranim markerom FIB_K i genom *bla*_{KPC} još od njegovog otkrića sredinom 1990-ih (Wyres i sur., 2020.). Osim toga, gen *bla*_{KPC} prvenstveno je povezan s plazmidima tipa IncFII, iako je prisutan i u drugim skupinama (IncI2, IncX, IncA/C, IncR, ColE), a često se javlja u kombinaciji s genima otpornosti na aminoglikozide, kinolone, trimetoprim, sulfonamide i tetracikline (Carattoli, 2013.; Jelić, 2018.). Prisutnost insercijske sekvence ISAb₁₂₅ (eng. *Insertion Sequence A. baumannii* 125) u svim dosad opisanim izolatima *A. baumannii* koji su nosili gen *bla*_{NDM}, upućuje na to da je primarno transpozon Tn125 odgovoran za mobilizaciju gena *bla*_{NDM} (Acman i sur., 2022.). Značajna povezanost između geografskog podrijetla izolata i konstrukcije plazmida koji nose gen *bla*_{NDM} sugerira da je globalno širenje gena *bla*_{NDM} prvotno potaknuto uzastopnim prijenosima između transpozona i plazmida, a kasnija se razmjena plazmida ograničila na specifične bakterijske domaćine. Do sada je gen *bla*_{NDM} povezan s najmanje 20 različitih tipova plazmida, prvenstveno IncFIB, IncFII, IncA/C (IncC), IncX3, IncH i IncL/M (Acman i sur., 2022.). U drugu ruku, gen *bla*_{OXA-48} ekskluzivno je povezan s konjugativnim plazmidima IncL/M (~ 65 kb) koji rijetko sadrže dodatne gene rezistencije. Karbapenemaza OXA-48 je prvobitno bila endemična za Tursku i Sredozemlje, ali je vremenom postala marker otpornosti za većinu enterobakterija na globalnoj razini (Berger i sur., 2013.; Jelić, 2018.; Boyd i sur., 2022.).

2.5. Otkriće i uloga sustava CRISPR-Cas

Istraživanja bakterijskih genoma tijekom 1980-ih godina omogućila su identifikaciju do tada nepoznatih ponavljajućih genetskih elemenata, čija je uloga ostala enigmatična sve do početka 21. stoljeća. Jedan od prvih značajnih koraka na ovom području dogodio se kada je japanski znanstvenik Yoshizumi Ishino sa suradnicima sekvencirao regiju genoma bakterije *E. coli* koja je obuhvaćala područje oko gena *iap* (eng. *isozyme of alkaline phosphatase*). Tijekom analize rezultata, prvotno je otkriveno pet homolognih sekvenci od 29 nukleotida koje su nazvane izravnim ponavljanjima (eng. *direct repeats*) s 32 nukleotida između (eng. *spacing*). Ove neobične palindromske sekvence smještene su nizvodno od stop kodona gena *iap* te nisu pokazivale sličnost s dotad poznatim ponavljajućim nizovima u prokariotskim genomima (Slika

4.) (Ishino i sur., 1987.; Mitić, 2023.). Nedugo nakon, Nakata i sur. su 1989. godine proširili spoznaju o ovim sekvencama otkrivši ponavljajuće sljedove na kromosomu soja *E. coli* K-12, C600 i Ymel, ali su potvrdili i prisutnost sličnih sekvenci u drugim enterobakterijama poput *Salmonella typhimurium* i *Shigella dysenteriae*. U međuvremenu, Hermans i sur. su opisali klaster direktnih ponavljanja kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* kao specifično područje (eng. *hot-spot*) za integraciju insercijskih elemenata u kromosom (Nakata i sur., 1989.; Hermans i sur., 1991.). Slične strukture su 1990-ih pronađene i u arhejama, a napretkom metoda sekvenciranja otkriveno je da su ti ponavljajući elementi prisutni u velikom broju prokariotskih genoma, ali ne i u eukariotima (Mojica i sur., 1995.; She i sur., 2001.).



Slika 4. Prikaz ponavljajućih palindromskih sekvenci soja *E. coli*, nizvodno od stop kodona gena *iap*. Prvih pet sekvenci unutar crvenog okvira su direktna ponavljanja (29 pb) odvojena varijabilnim sljedovima (32 pb). Crnim strelicama u rozom okviru označeni su palindromski nukleotidi u direktnim ponavljajućim sljedovima. Daljnja analiza pokazala je ukupno 14 ponavljajućih sekvenci, što je shematski prikazano ispod sekvenci. Preuzeto i prilagođeno prema radovima Ishino i sur. (1987.) i Mitić (2023.).

Povezanost ovih sekvenci s mehanizmima zaštite mikroorganizama od napada stranom DNA, odnosno adaptivnim imunskim sustavom, dugo je ostala nejasna. No, početkom 21. stoljeća, prepoznata je njihova međusobna funkcionalna povezanost jer je primijećeno da se slični elemenati SRSR (eng. *Short Regularly Spaced Repeats*) javljaju u vrlo udaljenim filogenetskim skupinama (Mojica i sur., 2000.). Zbog terminološke neujednačenosti i različitih naziva korištenih za iste strukture, 2002. godine je predložen standardizirani naziv CRISPR (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) koji je postao općeprihvaćen u znanstvenoj literaturi (Jansen i sur., 2002.). Uz lokuse CRISPR, genomske

analize otkrile su i gene *cas* (eng. *CRISPR-associated genes*) koji se nalaze u neposrednoj blizini lokusa. Posebno su se istaknuli geni *cas1*, 2, 3 i 4, koji su pokazali visoku evolucijsku očuvanost, gdje je gen *cas1* pronađen u svim vrstama s lokusima CRISPR, dok su ostala tri gena bila prisutna u većini, ali ne u svim genomima koji sadrže CRISPR (Jansen i sur., 2002.). Osim gena *cas* spoznala se prisutnost višestrukih kratkih ponavljanja s minimalnim varijacijama unutar specifičnog lokusa; kao i da se između ovih ponavljanja nalaze "neponavljajuće" razmaknice slične veličine; da većina vrsta koje sadrže više lokusa CRISPR također imaju zajedničku vodeću sekvencu; i da nema dugih otvorenih okvira čitanja (eng. *Open Reading Frame*, ORF) prisutnih unutar lokusa. Iako je do 2002. godine sustav CRISPR-Cas otkriven u preko 40 prokariotskih organizama, isti nije pronađen u sojevima *K. pneumoniae* (Jansen i sur., 2002.).

Prava funkcija sustava CRISPR-Cas postala je jasnija tek 2005. godine kada su dvije zasebne istraživačke grupe primijetile da veliki postotak razmaknica između direktnih ponavljanja odgovara sekvencama bakteriofaga, profaga i plazmida, dok preostali dio odgovara kromosomskim sekvencama. Ovo je dovelo do hipoteze da sustav CRISPR-Cas predstavlja adaptivni imunski sustav prokariota koji kontrolira kretanje ekstrakromosomskih elemenata poput bakteriofaga (ili profaga) koji mogu dovesti do lize stanice, odnosno plazmida koji često nose gene otpornosti na antimikrobne lijekove (Mojica i sur., 2005.; Pourcel i sur., 2005.). Pourcel i sur. su također ukazali na osnovna "pravila" evolucije sustava CRISPR: (1) mogu se pojaviti slučajne delecije razmaknica, ali i ponavljanja; (2) dodavanje novih razmaknica je usmjereno te zahtijeva dupliciranje direktnog ponavljanja uz vodeću sekvencu te kopiranje i dodavanje nove sekvence DNA (razmaknice); (3) prisutnost identičnih razmaknica u lokusima CRISPR odražava zajedničko podrijetlo, a ne nezavisne događaje (Pourcel i sur., 2005.). U isto vrijeme se eksperimentalno dokazalo da postoji korelacija između broja razmaknica virusnog podrijetla i razine otpornosti bakterije na infekciju bakteriofagom te se istovremeno sugeriralo da geni *cas* sudjeluju u ovom obrambenom procesu (Bolotin i sur., 2005.). Ova hipoteza je 2007. godine konačno i potvrđena kada je dokazano da bakterija *Streptococcus thermophilus* može postati otporna na infekciju bakteriofagima ako se u lokusu CRISPR nalazi odgovarajuća sekvenca faga, odnosno da je bakterija osjetljiva ako sekvenca razmaknice nedostaje, a otpornost osigurava "enzimska mašinerija Cas" (Barrangou i sur., 2007.).

Nedugo nakon toga, otkriveno je da više proteina Cas, s naglaskom na helikazu Cas3, sudjeluje u procesiranju CRISPR-RNA (cr-RNA), nastale transkripcijom lokusa CRISPR, što omogućuje zreloj, navodećoj crRNA specifično prepoznavanje ciljnih sekvenci. Time lokusi CRISPR ne samo da su ključan mehanizam antivirusne obrane, već reguliraju različite

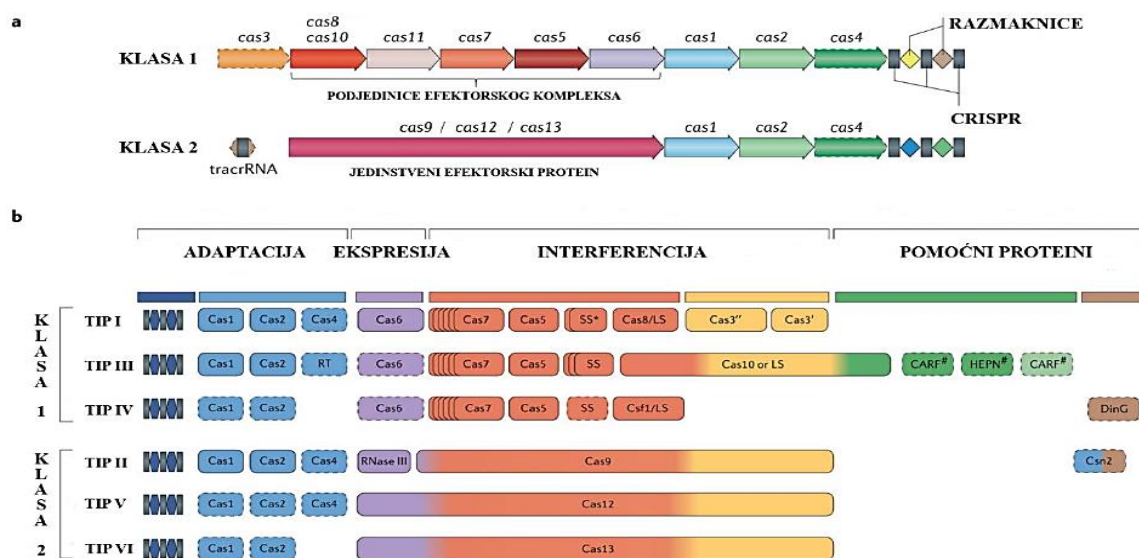
mehanizme HGT-a (Marraffini i Sontheimer, 2008.; Brouns i sur., 2008.). Danas je poznato da se odgovor CRISPR-Cas sastoji od tri ključne faze. U fazi adaptacije, specifični kompleks proteina Cas prepoznaje stranu nukleinsku kiselinu i odabire kraće fragmente u blizini kratke sekvence PAM (eng. *Protospacer-Adjacent Motif*). Zatim kompleks izrezuje protorazmaknicu (eng. *protospacer*) određene duljine koja se, nakon dupliciranja direktnih ponavljajućih sekvenci lokusa CRISPR, inkorporira u lokus kao nova razmaknica (eng. *spacer*). U nekim sustavima, alternativni mehanizam omogućava uzimanje razmaknice iz RNA putem reverzne transkripcije. Tijekom faze ekspresije, cijeli lokus CRISPR se prepisuje u jedan pre-crRNA transkript, koji se procesira u zrelu crRNA molekulu koja sadrži sekvencu razmaknice i direktna ponavljanja. U konačnoj fazi interferencije, crRNA ostaje vezana uz svoj efektorski kompleks i služi kao vodič za prepoznavanje te kasniju razgradnju ciljne DNA ili RNA (Makarova i sur., 2015.; Mohanraju i sur., 2016.)

2.6. Klasifikacija, distribucija i primjena sustava CRISPR-Cas

U odnosu na prethodnu klasifikaciju sustava CRISPR-Cas iz 2015. godine, koja opisuje 5 tipova i 16 podtipova, daljnja istraživanja temeljena na kompleksnijim filogenetskim analizama i kohezivnim analizama bipartitnih mreža dijeljenja gena pokazala su veliku strukturnu i funkcionalnu raznolikost sustava, što je dovelo do klasifikacije u dvije glavne klase (1 i 2), šest tipova (I, II, III, IV, V, VI) i više od 33 podtipa (Slika 5.) (Makarova i sur., 2015.; Makarova i sur., 2020.; Pinilla-Redondo i sur., 2020.). Sustavi klase 1 (tip I, III, IV) karakterizirani su višekomponentnim, efektorskim proteinskim kompleksom, dok sustavi klase 2 (tip II, V, VI) koriste jedan ključni efektorski protein koji samostalno obavlja funkcije prepoznavanja ciljne sekvence, obrade pre-crRNA (direktno ili uz pomoć dodatnih enzima) te razgradnje ciljne nukleinske kiseline. Razlike u domenama ovih proteina, kao što su prisutnost domena „HNH“ i „RuvC-like“ kod Cas9 (tip II), isključivo domene „RuvC-like“ kod Cas12 (tip V) te dvojne domene „HEPN“ (eng. *Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain*) kod Cas13 (tip VI), osiguravaju specifičnost mehanizama cijepanja te određuju njihov cilj - DNA ili RNA (Shmakov i sur., 2017.; Makarova i sur., 2020.).

Osnovni proteini Cas (Cas1, Cas2, Cas3, Cas9, Cas10, Cas12 i Cas13) zaduženi su za primarne funkcije, ovisno o kojem tipu sustava CRISPR-Cas se radi. Uz njih, javljaju se i pomoćni gena koji često kodiraju za proteine s pomoćnom funkcijom (Makarova i sur., 2015.; Mohanraju i sur., 2016.; Makarova i sur., 2018.). Stoga se navedeni proteini mogu podijeliti u četiri međusobno preklapajuća funkcionalna modula. Adaptacijski modul podrazumijeva proteine Cas1 (integrazu) i Cas2, a u nekim podtipovima uključuje i nukleazu poput Cas4 te

reverznu transkriptazu. Enzim Cas6 predstavlja modul koji osigurava pretvorbu pre-crRNA u zrelu crRNA u sustavima klase 1, dok tipovi II koriste bakterijsku RNazu III, a kod nekih tipova V i VI veliki efektorski protein posjeduje vlastiti katalitički centar za obradu. Interferencijski modul, pomoću komplementarnosti crRNA, prepoznaje i cijepa ciljne nukleinske kiseline - u klasi 1 se sastoji od više proteina (npr. kompleks „Cascade“), dok je u klasi 2 zastupljen jednim multidomenskim proteinom (npr. Cas9, Cas12 ili Cas13) (Slika 5.). Modul za signalnu transdukciju i pomoćne proteine koji reguliraju signalne puteve u sustavima tipa III HEPN RNaze HEPN (npr. Csm6 ili Csx1) cikličnim oligoadenilatnim spojevima sintetiziranim od strane Cas10 (Mohanraju i sur., 2016.; Koonin i sur., 2017.; Makarova i sur., 2018.; Makarova i sur., 2020.).



Slika 5. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas u dvije klase (1 i 2) i šest tipova (I, II, III, IV, V, VI). a) Prikaz organizacije lokusa CRISPR sustava klase 1, u kojima efektorski kompleks čini više podjedinica, i sustava klase 2 u kojima je funkcija efektor koncentrirana u jednom proteinu. b) Prikaz šest tipova sustava CRISPR-Cas ovisno o sastavu i funkciji proteina Cas. Tamnoplava boja predstavlja lokuse CRISPR s umetnutim razmaknicama, koji su prisutni u svim sustavima. Proteini Cas, zaduženi za adaptaciju, označeni su svijetloplavom bojom, a oni koji sudjeluju u transkripciji i sazrijevanju crRNA prikazani su ljubičastom bojom, dok su proteini odgovorni za prepoznavanje strane DNA i/ili RNA označeni narančastom bojom. Proteini s nukleaznom aktivnošću istaknuti su žutom bojom, a pomoćni proteini prikazani su zelenom i smeđom bojom. Simbol ljestvi pokazuju da bi drugi nepoznati proteini mogli biti uključeni u isti signalni put. Zvezdica označava potencijalnu malu podjedinicu (eng. *small subunit*, SS) koja se može spojiti s velikom podjedinicom (eng. *large subunit*, LS) u određenim podtipovima tipa I. Elementi koji nedostaju u nekim podtipovima naznačeni su isprekidanim linijama. Trobojna shema za proteine Cas9, Cas10, Cas12 i Cas13 ilustrira da ovi proteini sudjeluju u različitim fazama djelovanja sustava CRISPR-Cas. Preuzeto i prilagođeno prema radovima Makarova (2020.) i Mitić (2023.).

Tipovi I–III dobro su proučeni te se nalaze na kromosomima bakterija i arheja, s tim da sustavi tipa I i II osiguravaju imunitet protiv strane DNA, a sustavi tipa III mogu ciljati DNA ili RNA (Newire i sur., 2020.). Tip IV se obično nalazi na plazmidima, ali mu nedostaju proteini krucijalni za fazu adaptacije (Cas1 i Cas2) koje vjerojatno "posuđuje" od sustava tipa I. Sustavi tipa V su evolucijski nastali iz transpozonski kodiranih nukleaza TnpB i pronađeni su samo kod arheja, dok tip VI uključuje sustave koji ciljaju RNA (Newire i sur., 2020.; Pinilla-Redondo i sur., 2020.; Makarova i sur., 2020.). Također su otkrivene, naizgled defektne, varijante sustava klase I, poput "minimalnih" sustava tipa I-F, I-B i I-E. Često su povezani s MGE-ovim (npr. Tn7-sličnim transpozonomima) i, premda ne posjeduju kompletnu interferencijsku funkciju (npr. nedostaje im Cas3), vjerojatno obavljaju druge, specijalizirane funkcije koje nadilaze adaptivnu imunost (Makarova i sur., 2020.).

Statistička analiza 13 116 genoma bakterija i arheja pokazala je neujednačenu distribuciju sustava CRISPR-Cas. Većina arheja (85.2 %) posjeduje CRISPR-Cas, a kod bakterija se javlja u oko 42.3 % genoma. Sustavi klase 2 se gotovo isključivo pojavljuju kod bakterija, dok su određeni tipovi klase 1, osobito tip III, značajnije zastupljeni u arhejama. Također, postoje taksonomske grupe, poput *Tenericutes*, u kojima su prisutni samo sustavi klase 2, dok kod pripadnika roda *Chlamydia* i *Candida*, sustav CRISPR-Cas uglavnom izostaje (Makarova i sur., 2020.).

Revolucionarna primjena sustava CRISPR-Cas dogodila se kada je otkriveno da primjena samo jedne efektorske nukleaze (Cas9) s dizajniranom ciljajućom gRNA (od eng. *guide*) omogućuje precizno ciljanje i cijepanje DNA, otvarajući mogućnosti za uređivanje genoma, a time i nove opcije za gensku terapiju i sintetsku biologiju (Jinek i sur., 2012.; Cong i sur., 2013.; Mali i sur., 2013.). Osim što su Cong i sur. 2013. godine dokazali da se Cas9 može usmjeriti kratkim molekulama RNA, kako bi precizno cijepale endogene genomske lokuse u ljudskim i mišjim stanicama, uvidjeli su i da se Cas9 može modificirati u enzim koji uzrokuje jednostruke lomove DNA, čime se olakšava popravak homolognom rekombinacijom uz minimalnu mutagenu aktivnost. Nadalje, prisutnost više ciljajućih sekvenci kloniranih na plazmidu, omogućuje istodobno uređivanje više lokusa unutar genoma sisavaca, čime se dodatno istakla široka primjenjivost tehnologije RNA-usmjerenih nukleaza (Cong i sur., 2013.) Modifikacije sustava, poput mutanta dCas9 (eng. *dead*) bez nukleazne aktivnosti, omogućile su precizno obilježavanje dijelova DNA vezanjem fluorescentno obilježenog dCas9 za sekvencu od interesa, i regulaciju ekspresije gena vezanjem istog za promotorsku regiju kada je fuzioniran s represorom ili aktivatorom transkripcije (Bikard i sur., 2013.; Chen i sur., 2013.). Također, istražuju se i drugi efektorski proteini, poput Cas12 i Cas13, koji se koriste za uređivanje gena

za toleranciju na biotičke čimbenike u biljkama, ali i u kliničkoj medicini kod primjene ciljane genske terapiju za razne bolesti, uključujući karcinome (Mascarenhas i sur., 2024.; Morris i Chan, 2015.; Qin i sur., 2024.). Uz primjenu u uređivanju genoma, tehnologija CRISPR-Cas pokazala je potencijal u antimikrobnoj terapiji, omogućujući eliminaciju bakterijskih patogena otpornih na antibiotike s posebnim naglaskom na enterobakterije, i to u prvom redu sojeve *E. coli* koji se najčešće koriste kao modelni organizmi (Bikard i sur., 2014.; Backes i Phillips, 2021.).

Tehnologija CRISPR-Cas9 također je primijenjena i na kliničkim izolatima *K. pneumoniae* divljeg tipa za inaktivaciju gena povezanih s antimikrobnom otpornošću. Zanimljivo je i da se endogeni sustavi CRISPR-Cas mogu iskoristiti za uređivanje genoma, uključujući članove reda Enterobacterales s funkcionalnim sustavima CRISPR-Cas klase I. Primjerice, tip I-F soja *Pectobacterium atrosepticum* sadrži sekvence razmaknica homologne vlastitom genomu, što upućuje na mogućnost da je samociljanje evolucijski pokretač ovog soja (Backes i Phillips, 2021.).

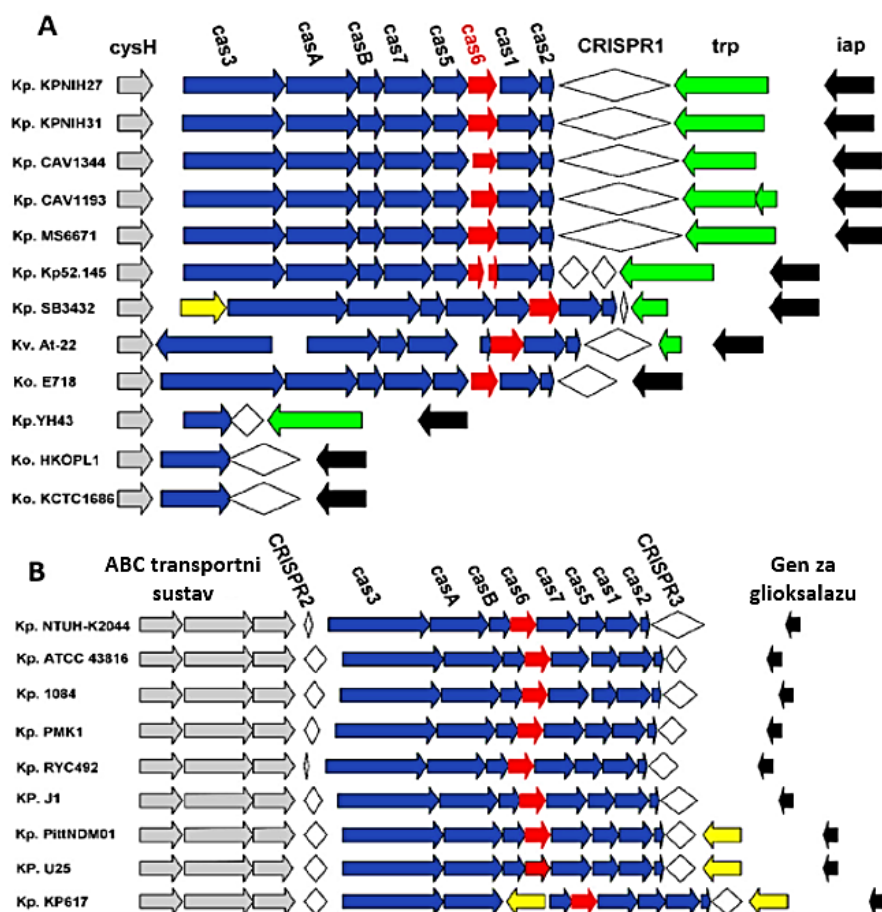
2.7. Sustav CRISPR-Cas bakterije *K. pneumoniae* – raznolikost, organizacija i mehanizam djelovanja

Već je ranije spomenuto da je bakterija *K. pneumoniae* poznata po svojoj sposobnosti akumulacije faktora virulencije i razvijanja višestruko otpornih fenotipova putem HGT-a, ponajviše u bolničkom okruženju (Montazeri i sur., 2024.; Kadkhoda i sur., 2024.). U kontekstu sve učestalije otpornosti na široki spektar antimikrobnih lijekova, razumijevanje imunskih obrambenih mehanizama ove bakterije, poput sustava CRISPR-Cas, postaje ključno za razvoj novih terapijskih strategija i kontrole prijenosa gena otpornosti na antimikrobne lijekove (Kadkhoda i sur., 2024.). Iako aktivni sustav CRISPR-Cas može ograničiti ulazak plazmida koji nose gene otpornosti, njihova zastupljenost u sojevima *K. pneumoniae* nije univerzalna (Wang i sur., 2020.; Alkompoz i sur., 2023.; Jwair i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.; Montazeri i sur., 2024.; Li i sur., 2025.).

U sojevima bakterije *K. pneumoniae* najčešće su prisutni sustavi CRISPR-Cas klase 1 tipa I. Prvotno je u većini ispitivanih sojeva otkriven sustav CRISPR-Cas tipa I-E, koji se sastoji od osam ključnih gena (*cas3*–*cas8/casA*/*cse1*–*cas11/casB*/*cse2*–*cas6*–*cas7*–*cas5*–*cas1*–*cas2*) te jednog ili dva lokusa CRISPR (Shen i sur., 2017.; Li i sur., 2025.). U sustavima tipa I-E, lokus CRISPR se nalazi u konzerviranoj regiji između regije gena *iap*, odgovornog za konverziju izoenzima alkalne fosfataze, i operona *cysH* zaduženog za biosintezu L-cisteina, što

osigurava stabilnu nasljednu prenosivost ovog imunskog sustava (Shen i sur., 2017.; Ishino i sur., 1987.; Mansilla i sur., 2000.). Osim klasičnog tipa I-E, 2017. godine je opisan i podtip I-E* nizvodno od ABC transportnog sustava, a uzvodno od gena glioksalaze. Analiza je pokazala da oba sustava dijele svih osam gena *cas*, pri čemu se razlikuje relativni položaj gena *cas6*, preciznije u jednom sustavu nalazi se nizvodno od *cas7-cas5*, dok je u drugom pomaknut uzvodno. Također postoji znatna filogenetska razlika u proteinu Cas1 kod ova dva sustava, ali zato unutar istog tipa I-E ili I-E*, većina proteina Cas dijeli više od 90 % identiteta aminokiselina, a neki čak i 100 %. Osim toga, različit je specifičan set sekvenci PAM za tip I-E (5'-AAG-3' ili 5'-ATG-3'), u odnosu na tip I-E* za koji je karakteristična sekvenca PAM 5'-NAA-3' (Shen i sur., 2017.). Prema relativnoj poziciji na kromosomu lokusi CRISPR kategorizirani su kao CRISPR1, CRISPR2 i CRISPR3 gdje je lokus CRISPR1 specifičan za tip I-E, a lokusi CRISPR2 i 3 su specifični za tip I-E* (Slika 6.).

U navedenim lokusima su kratka direktna ponavljanja veličine od 29 do 48 pb međusobno razdvojena razmaknicama, koje potječu iz strane DNA, veličine od 21 do 72 bp, dok su geni *cas* organizirani u operon te kodiraju za proteine s različitim funkcijama i mehanizmima djelovanja (Shen i sur., 2017.). Proteini Cas8 (ili CasA) i Cas11 (ili CasB), prema prijašnjoj nomenklaturi, sada su poznati kao Cse1, odnosno Cse2 (Shen i sur., 2017.; Ostria-Hernández i sur., 2015.; Hille i sur., 2018.).



Slika 6. Prikaz organizacije lokusa CRISPR i gena *cas* sustava CRISPR-Cas tipa I-E (A) i tipa I-E* (B) s obzirom na uzvodne i nizvodne gene - regiju *iap-cysH* i regiju ABC transportnog sustava i gena za gliksalazu. Bijeli "dijamanti" predstavljaju lokuse CRISPR1, 2 i 3; plave strelice predstavljaju gene *cas*, izuzev *cas6* (crvene strelice); sive i crne strelice predstavljaju gene uzvodno i nizvodno od lokusa CRISPR; žute strelice predstavljaju transpozone; a zelene strelice predstavljaju gen koji kodira tetratrikopeptidni ponavljajući protein. Preuzeto i prilagođeno prema radu Shen i sur. (2017.).

Geni *cas1* i *cas2* kodiraju za adaptivni kompleks $(Cas1)_4-(Cas2)_2$ koji veže protorazmaknicu na dva aktivna mjesta unutar proteina Cas1 (metalo-deoksiribonukleaza i integraza) koja se nalaze s obje strane dimera Cas2. Time se precizno definira razmak između aktivnih mjesta, a posljedično i optimalna duljina fragmenta DNA koji će biti integriran nakon što se iz njega ukloni sekvenca PAM (Killelea i sur., 2023.). Ugradnja svake nove razmaknice zahtijeva sintezu novog direktnog ponavljanja. Protein Cas2 je RNAza specifična za regije bogate uracilom koja olakšava odabir i/ili integraciju razmaknice, a pretpostavlja se da sudjeluje i u cijepanju crRNA (Makarova i sur., 2011.; Killelea i sur., 2023.).

Skup gena *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5* i *cas6* kodira za proteine koji tvore efektorski kompleks Cascade ((Cas5)₁-(Cas6)₁-(Cas7)₆-(Cse1)₁-(Cse2)₂) molekularne težine 405 kDa koji veže crRNA te je odgovoran za prepoznavanje strane DNA. Ključnu ulogu u prepoznavanju strane DNA ima tzv. sekvenca "seed", odnosno prvih osam nukleotida PAM-proksimalnog dijela crRNA, izuzev šestog nukleotida koji ne komplementira sa sekvencom PAM. Mutacije u sekvenci "seed" značajno smanjuju vezanje kompleksa Cascade, što potvrđuju ispitivanja provedena na sojevima bakterije *E. coli* (Shen i sur., 2017.; Hille i sur., 2018.). Okosnicu kompleksa Cascade čine "misteriozni" proteini povezani s ponavljanjem (eng. *Repeat-Associated Mysterious Proteins* RAMPs), Cas5 i Cas7, koji sadrže domenu za prepoznavanje RNA (eng. *RNA Recognition Motif*, RRM). Treći protein iz skupine RAMP, Cas6, je RNAza (endonukleaza) odgovorna za obradu pre-crRNA. Upravo su ova tri proteina predstavnici tri velike skupine "nadskupine" RAMP. Cse1 i Cse2 su mali proteini alfa heliks oblika, najčešće prisutni u dvije kopije u slučaju Cse2, a čine malu podjedinicu kompleksa Cascade (Makarova i sur.; 2020.; Makarova i sur., 2011.). Kada se kompleks Cascade, zajedno s crRNA, vezao za ciljnu sekvencu strane DNA, formira se R-petlja/omča (eng. *R-loop*) koja omogućuje dovođenje proteina Cas3 koji ima ATP-ovisnu helikazu i nukleaznu funkciju i sudjeluje u razdvajanju lanaca strane dvolančane DNA i njenom cijepanju (Makarova i sur., 2011.).

Kamruzzaman i sur. su 2020. godine po prvi put opisali jedinstveni sustav CRISPR-Cas tipa IV koji se ne pojavljuje na bakterijskom kromosomu, a pronađen je u 44 plazmida iz vrsta roda *Klebsiella*. Identičan sustav je pronađen i u tri plazmida drugih vrsta enterobakterija, također s razmaknicama koje potječu s različitih plazmida i kromosoma (Kamruzzaman i Iredell, 2020.). Nedugo zatim, opisan je sustav CRISPR-Cas tipa IV-A koji je pronađen specifično na plazmidima enterobakterija IncHI1B/IncFIB, s naglaskom na tri klinička izolata *K. pneumoniae*. Ovaj sustav posjeduje jedan lokus CRISPR smješten neposredno uz operon Cas. Razmaknice u tom lokusu pokazuju visok stupanj konzerviranosti te su često homologne dijelovima gena plazmida IncFIIK/IncFIB(K), što implicira ulogu u interplazmidnoj kompeticiji (Newire i sur., 2020.). Genetska organizacija sustava CRISPR-Cas tipa IV-A uključuje jedinstvenu raspodjelu gena *cas*, a prisutnost transpozona u blizini nagovještava horizontalni prijenos među sojevima enterobakterija što je primijećeno i kod sustava tipa I-E i I-E* u istraživanju Shen i sur. iz 2017. godine (Newire i sur., 2020.; Shen i sur., 2017.).

Plazmidni sustavi enterobakterija tipa IV karakteristični su po tome što, za razliku od kromosomskih sustava, ne sadrže gene *cas1* i *cas2* za uzimanje novih razmaknica

(Kamruzzaman i Iredell, 2020.). Također im nedostaju i geni koji kodiraju za enzime s nukleaznom aktivnošću (*cas3* ili *cas10*), ali je pronađen gen sličan genu *cas10* (Makarova i sur., 2015.; Kamruzzaman i Iredell, 2020.). Pretpostavlja se da je sustav tipa IV sličan prvotnom imunosnom sustavu "bakterije pretka" koji je stekao sposobnost prilagodbe povezivanjem s elementom sličnim transpozonom koji sadrži gene *cas1* i *cas2* (Koonin i Krupovic, 2015.; Rath i sur., 2015.). Transpozon je "udomaćen", ali je zadržao završna "invertna" ponavljanja iz kojih su dupliciranjem nastala palindromska direktna ponavljanja CRISPR, a razmaknice su dodane djelovanjem proteina Cas1. Proces je u konačnici rezultirao formiranjem sustava CRISPR-Cas tipa I i III (Nuñez i sur., 2015.; Rath i sur., 2015.). Osim toga, vrlo je vjerojatno da ovaj plazmidni sustav tipa IV ovisi o tipu I-E i/ili I-E*, točnije da koristi proteine Cas1 i Cas2 navedenih sustava jer je prisutan samo kod sojeva koji imaju iste. Ova hipoteza bi mogla biti točna jer je procesiranje RNA i stvaranje efektorskog kompleksa eksperimentalno dokazano kod sustava tipa IV u soju *Aromatoleum aromaticum* koji koristi kromosomski sustav tipa I-C za funkcionalnu ugradnju razmaknica (Özcan i sur., 2019; Kamruzzaman i Iredell, 2020.). Stoga se plazmidni sustavi, iako sami ne posjeduju gene *cas1* i *cas2*, vjerojatno oslanjaju na komplementarnu funkciju kromosomskih sustava koji im potpomažu u obrani od invazivnih elemenata. Razmaknice sustava CRISPR-Cas, porijeklom s kromosoma i plazmida, kod sojeva *K. pneumoniae* su dokaz da ovi sustavi ciljaju veliki broj plazmida, što dodatno sugerira moguće ključne uloge sustava CRISPR-Cas u epidemiologiji velikih plazmida koji često nose gene otpornosti na razne antimikrobne lijekove (Shen i sur., 2017.; Newire i sur., 2020.; Kamruzzaman i Iredell, 2020.).

2.8. Dosadašnja saznanja o povezanosti sustava CRISPR-Cas i otpornosti na antimikrobne lijekove kod sojeva *K. pneumoniae*

Sojevi bakterije *K. pneumoniae* otporni na karbapeneme predstavljaju ozbiljan javnozdravstveni problem s obzirom na ograničene terapijske mogućnosti liječenja teških infekcija uzrokovanih ovim bakterijama. Mehanizmi otpornosti u prvom redu uključuju proizvodnju karbapenemaza, čiji geni *bla* se uglavnom nalaze na plazmidima koji su glavna meta sustava CRISPR-Cas podtipova I-E i I-E*, kako je opisano u poglavljima 2.4., 2.5. i 2.6..

Uloga sustava CRISPR-Cas u ograničavanju HGT-a, koji dovodi do otpornosti na antibiotike, sve se više istražuje, pri čemu dosadašnja istraživanja pokazuju da prisutnost ovog sustava može biti povezana s nižom učestalošću gena otpornosti na antimikrobne lijekove (Li i

sur., 2018.; Liao i sur., 2020.; Wang i sur., 2020.; Owaid i Al-Ouqaili, 2024.). Odnosno, manje je vjerojatno da će patogeni sojevi *K. pneumoniae* sa sustavom CRISPR-Cas nositi gene otpornosti na karbapeneme nego oni koji nemaju ovaj obrambeni sustav. Prvo istraživanje koje je opisalo ovu korelaciju napravljeno je 2018. na Tajvanu, otkrivši da su sojevi koji su sadržavali podtip I-E*, imali smanjen broj plazmida, profagnih regija i stečenih gena otpornosti na antibiotike (Li i sur., 2018.). Nedugo nakon toga, u istraživanju provedenom na 168 kliničkih izolata *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme, učestalost gena *bla_{KPC}* bila je značajno viša u CRISPR-Cas negativnim izolatima nego u onima s tipovima I-E ili I-E*, dok su Wang i sur. otkrili da su se sekvence razmaknica unutar lokusa CRISPR podudarale s genomima plazmida ili faga, od kojih su neki nosili gene povezane s otpornosti na antimikrobne lijekove (Liao i sur., 2020.; Wang i sur., 2020.). Slično istraživanje provedeno na 181 kliničkom izolatu *K. pneumoniae* i 888 cjelovitih sekvenci genoma preuzetih iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) je pokazalo da su CRISPR-Cas negativni sojevi sadržavali veći broj plazmida i gena otpornosti te da je prevalencija određenih gena otpornosti, poput *bla_{KPC}*, bila značajno viša u genomima CRISPR-Cas negativnih sojeva (Alkompoz i sur., 2023.). Suprotno tomu, studija provedena na 156 izolata *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme je pokazala da je učestalost gena *bla_{NDM}* bila značajno viša u izolatima s podtipom I-E CRISPR-Cas sustava, a druga studija, u Kini, je utvrdila da plazmidi IncFII koji nose gene *bla_{KPC}* mogu koegzistirati sa sustavima CRISPR-Cas tipa I-E* u sojeva *K. pneumoniae* ST15 (Kadkhoda i sur., 2025.; Hu i sur., 2023.). Važno je napomenuti i da u objavljenim genomima izolata klonalnog kompleksa 258 (ST11 i ST258), koji predstavljaju najveću klonalnu skupinu *K. pneumoniae* otpornu na više lijekova na globalnoj razini, još uvijek nije identificiran niti jedan sustav CRISPR-Cas (Li i sur., 2018.; Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.).

Analizom profila osjetljivosti na niz testiranih antimikrobnih lijekova, većina dosadašnjih istraživanja je utvrdila da izolati *K. pneumoniae* sa sustavom CRISPR-Cas pokazuju veću osjetljivost na određene antibiotike u usporedbi sa sojevima u kojima sustav izostaje. Tako su izolati s podtipom I-E* bili značajno osjetljiviji na ampicilin-sulbaktam, cefazolin, cefuroksim i gentamicin u usporedbi s kliničkim izolatima *K. pneumoniae* bez sustava CRISPR-Cas, dok je istraživanje Jwair-a i sur. pokazalo da je otpornost na imipenem i ertapenem bila značajno niža kod CRISPR-Cas pozitivnih izolata (Li i sur., 2018.; Jwair i sur., 2023.). Uz to, studija Hu i sur. je pokazala da su izolati sa sustavom CRISPR-Cas pokazali veću osjetljivost na deset ispitivanih antimikrobnih lijekova, uključujući karbapeneme, u usporedbi

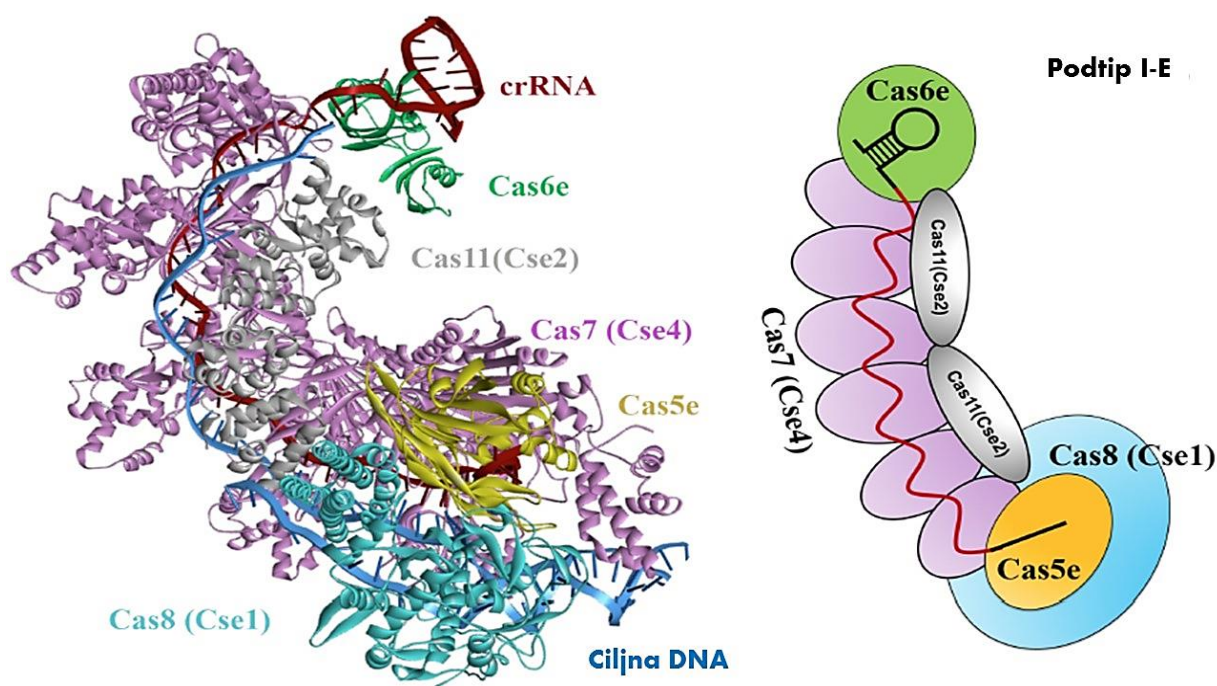
s CRISPR-negativnim izolatima (Hu i sur., 2023.). Također, kod sojeva *K. pneumoniae*, koje proizvode karbapenemaze, razina antimikrobne otpornosti se povećava od sojeva "MDR" (eng. *Multidrug-resistant*), "XDR" (eng. *Extensively drug-resistant*) pa do "PDR" (eng. *Pandrug-resistant*), dok učestalost pojavljivanja sustava CRISPR-Cas opada (Owaid i Al-Ouqaili, 2024.). Studije su također pokazale da je u nekim višestruko otpornim izolatima *K. pneumoniae* sustav CRISPR-Cas inaktivan. Smatra se da su sustavi ranije bili široko rasprostranjeni, ali su vjerojatno zbog selektivnog pritiska postali nefunkcionalni te u tom slučaju isti vjerojatno nisu učinkovita prepreka širenju gena otpornosti koji se nalaze na plazmidima (Tao i sur., 2022.; Owaid i Al-Ouqaili, 2024.).

Prevalencija sustava CRISPR-Cas tipa I među izolatima *K. pneumoniae* ovisi o mnoštvu faktora, pa tako i o geografskom položaju. Analiza 1607 genoma *K. pneumoniae* pokazala je da je gotovo jedna četvrtina sojeva imala sustav CRISPR-Cas, od čega ih je 220 pripadalo podtipu I-E*, koji je bio značajno češći u Aziji, a 183 podtipu I-E specifičnijem za europske zemlje (Kannadasan i sur., 2023.). Prema podacima preuzetih iz baze podataka NCBI, sustav CRISPR-Cas je prisutan u 14-42 % slučajeva, gdje je u nekim istraživanjima češći podtip I-E, a u drugima pak I-E* (Li i sur., 2018.; Wang i sur., 2020.; Liao i sur., 2020.; Alkompoz i sur., 2023.; Hu i sur., 2023.; Owaid i Al-Ouqaili, 2024.; Kadkhoda i sur., 2024.).

Osim što može ograničiti horizontalni prijenos plazmida s genima otpornosti na antimikrobne lijekove, sustav CRISPR-Cas može se koristiti i kao alat za uređivanje genoma bakterija. Potrebno je dizajnirati vodeću RNA (eng. *guide RNA*, gRNA) koja usmjerava mašineriju Cas da cilja regiju gena otpornosti na antimikrobne lijekove ili specifične sekvence otpornih sojeva *K. pneumoniae*, čime se ponovo uspostavlja osjetljivost na pojedine antibiotike ili dolazi do „eliminacije“ bakterije. Kao vektori za prenošenje sustava CRISPR-Cas u bakteriju koriste se plazmidi, izvanstanične vezikule, bakteriofagi ili nanočestice (Tao i sur., 2022.). U slučaju *K. pneumoniae*, mogao bi se iskoristiti vlastiti endogeni sustav CRISPR-Cas tipa I na način da se dizajnira umjetni sustav mini-CRISPR na plazmidu koji će omogućiti ekspresiju dizajnirane crRNA. Ovisno o aktivnosti kompleksa Cascade i nukleaze Cas3, doći će ili do interferencije i smrti bakterije ili se sustav može koristiti za regulaciju ekspresije gena ako nema nukleaze Cas3 (Zheng i sur., 2020.).

Tako su Gomaa i sur. ciljali genom endogenim sustavom tipa I-E iz *E. coli* (Slika 7.) i učinak pratili mjerenjem „stope bijega stanica“ (eng. *cell escape rates*). Rezultati su pokazali da usmjeravanje crRNA na jedno ili više mjesta unutar kodirajućih ili nekodirajućih regija, bilo

esencijalnih ili neesencijalnih gena, rezultira dramatično niskom „stopom bijega stanica“, odnosno preživljenjem. Time je dokazano da je ciljanje učinkovito, specifično i fleksibilno, budući da zahtijeva samo prisutnost ciljne sekvence s optimalnim PAM-om (Gomaa i sur., 2014.; Zheng i sur., 2020.). Slično istraživanje o antimikrobnom potencijalu sustava CRISPR-Cas napravljeno je pomoću lambda profaga u koji je dodan lokus CRISPR koji eksprimira crRNA usmjerene na gene otpornosti na antibiotike u stanicama domaćina *E. coli*. Primitkom ovog dizajniranog endogenog sustava, "lizogenizirana" stanica postaje "imunizirana" protiv vlastitih gena otpornosti na antibiotike, odnosno postaje osjetljiva na ciljne antimikrobne lijekove te blokira daljnje preuzimanje ciljnih gena otpornosti. Na taj način "litički" lambda profag ustrajno napada zaostale stanice *E. coli* otporne na antibiotike, čime se osigurala selektivna prednost osjetljivih stanica (Yosef i sur., 2015.; Zheng i sur., 2020.).



Slika 7. Struktura tipa I-E kompleksa Cascade bakterije *E. coli* koja se veže na ciljnu dvolančanu DNA (lijevo) i simulirani model prema strukturi (desno). Preuzeto i prilagođeno prema radu Zheng i sur. (2020.).

Za ciljano inaktiviranje bakterijskih gena može se kombinirati sustav CRISPR-Cas9 za cijepanje genoma te sustav lambda Red za rekombinaciju. Nadalje, razvijen je i sustav za preciznu konverziju C→T u kromosomskim i plazmidnim genima putem fuzije deaminaze citozina APOBEC1 i nikaze Cas9. Primjenom oba alata potvrđeno je da je gen *bla_{KPC-2}* ključni čimbenik odgovoran za karbapenemsku otpornost hipermukoviskoznog soja *K. pneumoniae*

rezistentnog na karbapeneme (Wang i sur., 2018.). Zahvaljujući ovim alatima 2019. godine napravljena je studija kojom su istraživane funkcije gena *mgrB*, *tetA* i *ramR* u posredovanju otpornosti na kolistin i tigeciklin kod sojeva *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme. Inaktivacija gena *tetA* ili *ramR*, odnosno gena *mgrB*, utjecala je na osjetljivost bakterija na tigeciklin ili kolistin, čime je pokazano da se sustav CRISPR-Cas9 može učinkovito primijeniti u inaktiviranju gena kod kliničkih sojeva *K. pneumoniae* (Sun i sur., 2019.). Ovakvi koncepti i rezultati pružaju čvrstu osnovu za daljnja istraživanja i razvoj inovativnih antimikrobnih alata temeljenih na sustavu CRISPR-Cas, čime se otvaraju nove perspektive u borbi protiv bakterijskih patogena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Popis materijala

3.1.1. Kemikalije i reagensi

- alfa-cijano-4-hidroksicinaminska kiselina (HCCA) matriks (5 x 200 mg) (Bruker Daltonik GmbH, Njemačka)
- Agaroz (BioReagent; Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Sterilna ultra-čista voda („Ambion™ Nuclease-Free Water”; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Agaroz niskog tališta („Agarose Low Melting”; Eurobio, Francuska)
- Agaroz za elektroforezu u izmjeničnom električnom polju („Pulsed Field Certified™ Agarose”; Bio-Rad, Laboratories, SAD)
- Borna kiselina (Sigma Life Science, SAD)
- Deionizirani formamid („Hi-Di™ Formamide”; Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Etanol 96% (Kemig, Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Glicerol (Kemig, Hrvatska)
- Lauroil-sarkozin (Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Natrijev dodecil-sulfat (Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Ledena octena kiselina (95 %-tna) (T.T.T, Hrvatska)
- Sterilna ultra-čista voda („Nuclease-Free Water”; Qiagen, Njemačka)
- Tris-baza („Trizma® base”; Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)

3.1.2. Antibiotici i inhibitori beta-laktamaza

- Komercijalni dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom ili antibiotikom + inhibitorom beta-laktamaza (Oxoid, UK; BioMaxima, Poljska):

- Ampicilin/amoksisilin (10 µg)
- Amoksisilin + klavulanska kiselina (20 + 10 µg)
- Cefaleksin (30 µg)
- Cefuroksim (30 µg)
- Ciprofloksacin (5 µg)
- Levofloksacin (5 µg)
- Cefpodoksim (10 µg)

- Cefiksim (5 µg)
- Gentamicin (10 µg)
- Amikacin (30 µg)
- Trimetoprim + sulfametoksazol (1.25 + 23.75 µg)
- Ceftazidim (10 µg)
- Cefotaksim (5 µg)
- Ceftriakson (30 µg)
- Cefepim (30 µg)
- Piperacilin + tazobaktam (30 + 6 µg)
- Ertapenem (10 µg)
- Imipenem (10 µg)
- Meropenem (10 µg)
- Ceftazidim + avibaktam (10 + 4 µg)
- Ceftolozan + tazobaktam (30 + 10 µg)
- Imipenem + relebaktam (35 µg)
- Cefiderokol (30 µg)

*Proizvođač antimikrobnih lijekova cefiksima, piperacilina i tazobaktama te imipenama i relebaktama je BioMaxima (Poljska). Proizvođač svih ostalih navedenih antibiotika je Oxoid (UK).

- Antibiotici koji se dodaju u selektivne hranjive podloge (Mueller-Hinton bujon):

- Meropenem prašak za otopinu za injekciju ili infuziju od 1000 mg (AptaPharma, UK)
- Imipenem prašak za otopinu za injekciju ili infuziju od 1000 mg (AptaPharma, UK)
- Kolistin prašak za otopinu za injekciju ili infuziju ($\geq 19\,000$ IU/mg) (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.3. Hranjive podloge i mediji

- Sastojci hranjivih podloga i medija:

- Krvni agar („Blood Agar Base No.2“; biolab, Hrvatska)
- Konjska krv („BIOSAP HCO“; BioGnost, Hrvatska)
- Agar Mueller-Hinton („Mueller-Hinton II Agar“; biolab, Hrvatska)
- Bujon Mueller-Hinton („Mueller-Hinton Broth“; Condalab, Španjolska)
- Agar MacConkey („MacConkey Agar No.3“; biolab, Hrvatska)

- Baza za bujon „Brucella“ („Brucella broth base“; Millipore, Merck, Njemačka)
- Glicerol (Fagron, Nizozemska)
- Demineralizirana (DEMI) H₂O

3.1.4. Boje korištene za vizualizaciju fragmenata DNA prilikom provođenja agarozne gel elektroforeze

- DNA-vezujuća boja za bojanje agaroznog gela „Sybr Safe“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Boja za nanošenje uzoraka na agarozni gel („Gel loading solution“; Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Ksilen-cijanól - komponenta 6 X pufera za nanošenje na agarozni gel (Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Bromfenol-plavo - komponenta 6 X pufera za nanošenje na agarozni gel (Fluka Analytical, Švicarska)
- 6 X pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel (0.25 % m/v bromfenol-plava, 0.25 % m/v ksilen-cijanól, 30 % v/v glicerol)

3.1.5. Standardi molekulskih masa (markeri veličina)

- „mi-Low Range DNA Marker Go“ (metabion, Germany)
- „O'GeneRuler™ Express DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- „GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- „CHEF® DNA Size Standard“ (Bio-Rad Laboratories, SAD)

3.1.6. Proteini, enzimi i pripadajući reakcijski puferi

- Alkalna fosfataza škampa (1 U/μL) („FastAP™“; Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Egzonukleaza I (20 U/μL) („Exonuclease I“; Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Hot Start Taq-polimeraza („Hot Start Pol“; Jena Bioscience, Njemačka)
- 10 X „HotStart Buffer complete“ (Jena Bioscience, Njemačka)
- Proteinaza K (20 mg/mL) (Qiagen, Njemačka)
- Restrikcijski enzim XbaI (10 U/μL) (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- 10 X Pufer Tango za restrikcijski enzim XbaI (Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.7. Komerrijalne smjese reagencija – kompleti

- Imunokromatografski test „RESIST-5 O.K.N.V.I.“ (Coris BioConcept, Belgija)
- 5 X „FIREPol® Master Mix“ (12.5 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Estonia)
- Kit za pročišćavanje PCR produkata („GeneJET PCR Purification Kit“; Thermo Fisher Scientific, SAD)
- „ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.8. Nukleinske kiseline

- Smjesa deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (2.5 mM) („Geneamp dNTP blend“; Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Nukleotidni sljedovi početnica (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) koje su korištene za amplifikaciju i detekciju gena lančanom reakcijom polimeraze i u reakcijama sekvenciranja prikazani su u tablicama od 1. do 3.

Tablica 1. Početnice korištene za detekciju gena koji kodiraju za karbapenemaze lančanom reakcijom polimeraze.

Naziv gena	Slijed nukleotida (5'-3')	Ta (°C)	Veličina PCR produkta (pb)
<i>bla_{KPC}</i>	F-TGTCACTGTATCGCCGTC	60	945
	R-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>bla_{IMP}</i>	F-GAAGGYGTTTATGTTCATAC		738
	R-GTAMGTTTCAAGAGTGATGC		
<i>bla_{NDM}</i>	F-CGGTTTGGCGATCTGGTTTT		207
	R-GACCGGCAGGTTGATCTCC		
<i>bla_{VIM}</i>	F-GTTTGGTCGCATATCGCAAC		155
	R-CCAATTTGCTTYTCAATCTCCG		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F-GCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCA		125
	R-TAACCACGCCCAAATCGAG		

Y (eng. *pyrimidine*) – označava pirimidinske baze citozin ili timin kod degenerativnih početnica

Ta (eng. *annealing temperature*) – temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA

Tablica 2. Početnice korištene za detekciju gena *cas1* i *rpoB* lančanom reakcijom polimeraze te lokusa CRISPR1, 2, i 3 lančanom reakcijom polimeraze i sekvenciranjem.

Naziv gena/CRISPR lokusa	Slijed nukleotida (5'-3')	Ta (°C)	Veličina PCR produkta (pb)
<i>rpoB</i>	F-GGCGAAATGGCWGAGAACCA	54	1120
	R-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
<i>cas1</i>	F-GCTGTTTGTCAAAGTTACCCGCGAACTC	58	150
	R-GGTTTTGATCGCCTCATGAGTCACAGTTG		
I-E CRISPR1	F-GACGGTGGTTATATGGTGAC	52	varijabilno (400-900)
	R-CATTGATGCCTCTACGTCAG		
I-E* CRISPR2	F-GTAGCGAAACCCTGATCAAGCG	57	varijabilno (900-1300)
	R-GCGCTACGTTCTGGGGATG		
I-E* CRISPR3	F-GACGCTGGTGCGATTCTTGAG	58	varijabilno (1300-2100)
	R-CGCAGTATTCTCAACCGCCT		

W (eng. *Weak*) – označava mjesto sa slabom A/T vezom (dvije vodikove veze) gdje može biti adenin ili timin kod degenerativnih početnica

Ta (eng. *annealing temperature*) – temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA

Tablica 3. Početnice korištene za analizu izolata bakterije *K. pneumoniae* metodom tipizacije sljedova više lokusa (eng. *MultiLocus Sequence Typing*, MLST).

Naziv gena	Naziv početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Ta (°C)	Veličina PCR produkta (pb)
<i>rpoB</i>	Vic3oF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA	55	1120
	Vic2oR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
	rpoB MLST 1f*	F-CCTGAAGGTCCGAACATC	*	/
<i>gapA</i>	gapA173oF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG	55	707
	gapA181oR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAAAGCGGCTTTGATGGCTT		
<i>mdh</i>	mdh130oF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG		801
	mdh867oR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTTCCCCAGCAGCAG		
<i>pgi</i>	pgi1FoF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC		~ 611
	pgi1RoR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
<i>phoE</i>	phoE604.1oF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG		647
	phoE604.2oRcv	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
<i>infB</i>	infB1FoF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG		507
	infB1RoR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTTCAGCTCAAGAACTTC		
<i>tonB</i>	tonB1FoF	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT		584
	tonB2RoR	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		
Univerzalne početnice za sekvenciranje	primer oF*	F-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	*	/
	primer oR*	R-TTGTGAGCGGATAACAATTTTC		

W (eng. *Weak*) – označava mjesto sa slabom A/T vezom (dvije vodikove veze) gdje može biti adenin ili timin kod degenerativnih početnica

Ta (eng. *annealing temperature*) – temperatura sparivanja početnice s kalupom DNA

* – Ta nije navedena za početnice korištene samo u svrhu sekvenciranja

3.1.9. Puferi i otopine

- 10 X TAE (40 mM Tris-baza, 1 % v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0)
- 5 X TBE (45 mM Tris-baza, 450 mM borna kiselina, 10 mM EDTA, pH 8.0)
- 10 X TE (100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0)
- Pufer za suspenziju bakterijskih stanica (100 mM Tris, 100mM EDTA, pH 8.0)
- Pufer za lizu bakterijskih stanica (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0, 1 % m/v lauroil sarkozin)
- Fiziološka otopina (0.9 % m/v NaCl)

3.1.10. Potrošni materijal

- Jednokratne nitrilne rukavice, bez pudera i lateksa (semprecare; nitrile skin2, UK)
- Sterilne polipropilenske tubice s poklopcem od 1.5 mL (Sarstedt, Njemačka)
- Tuba s čepom na navoj od 50 mL („Screw cap tube, 50 mL“; Sarstedt, Njemačka)
- Sterilne mikrobiološke eze od 1 µl (ProMed, Hrvatska)
- Jednokratni sterilni nastavci s filterom, raspona volumena od 0.1 do 10 µl; od 10 do 100 µl; od 20 do 200 µl; od 50 do 1000 µl, kompatibilni s pipetama „Eppendorf®“ (Eppendorf®, Njemačka)
- Staklena čaša od 500 mL
- Staklena tikvica od 3000 mL
- Polipropilenske tubice od 200 µL u nizu od 8 tubica s vezanim pojedinačnim poklopcima (Sarstedt, Njemačka)
- Polipropilenska epruveta za centrifugu volumena 50 mL (Corning, SAD)
- Polipropilenske tubice od 200 µL u nizu od 8 tubica („MicroAmp® Fast 8-Tube Strip“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polipropilenski poklopci u nizu od 8 („MicroAmp® 8 cap Strips“, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Polistirenska tubica za centrifugu od 1.5 mL (Eppendorf®, Njemačka)

3.1.11. Uređaji

- Maseni spektrometar „Bruker MALDI Biotyper“ (Bruker Daltonik GmbH, Njemačka)
- Mehaničke pipete raspona volumena od 0.1 do 10 µl; od 10 do 100 µl; od 20 do 200 µl; od 50 do 1000 µl (Eppendorf®, Njemačka)
- Uređaj za vrtloženje „Vibromix 10“ (Tehtnica, Domel, Slovenija)
- Uređaj za centrifugu „Centric 250“ s rotorom i adapterom prikladnim za tubice od 1.5 mL (Domel, Slovenija)
- Termoblok „Isotemp“ (Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „ProFlex 3×32-well PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- UV-Vis mikrovolumenski spektrofotometar „NanoDrop Lite“ (Thermo Fisher Scientific, SAD)

- Kadica za horizontalnu elektroforezu „VG-SYS Vari-gel Maxi Gel Electrophoresis System” (SCIE-PLAS, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Laboratorijska vaga „Kern EMB” (Kern & Sohn, Njemačka)
- Parafilm (Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)
- Ispravljač za horizontalnu elektroforezu „EPS 101” (Amersham Biosciences, SAD)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV svjetlošću „TFX-20.MC” (Vilber Lourmat, Francuska)
- DNA-sekvencer „ABI Prism 310” (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Kadica za horizontalnu elektroforezu „Sub-Cell® Model 96 cell” (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Ispravljač za horizontalnu elektroforezu „Powerpac™ Basic” (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Uređaj za centrifugu „Eppendorf Centrifuge 5417 R” (Eppendorf®, Njemačka)
- Uređaj za dobivanje ultra čiste vode klase 1 „Simplicity®” (Millipore, Merck, Njemačka)
- Uređaj za gel elektroforezu u izmjeničnom električnom polju „CHEF-DR® III” (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „Veriti™ Thermal Cycler” (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV svjetlošću „Genebox” (Syngene, UK)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV svjetlošću „OmniDOC” (Clever Scientific, UK)
- Vodena kupelj s treslicom (Thermo Forma, SAD)

3.2. Izolati bakterije *K. pneumoniae*

Istraživanje je provedeno na 400 sojeva *K. pneumoniae* izoliranih iz kliničkih uzoraka bolesnika Kliničkog bolničkog centra Zagreb, uzetih s različitih bolničkih odjela u svrhu rutinskih dijagnostičkih pretraga u razdoblju od siječnja 2021. godine do travnja 2024. godine. Klinički uzorci iz kojih su izolirani bakterijski sojevi obuhvaćali su: urin, bris rektuma, stolicu, bris grla, hemokulturu, bris rane, aspirat traheje, bronhoalveolarni lavat, iskašljaj, intraoperativni uzorak, bris nazofarinksa, bris prepone, ascites, perianalni bris, aksilarni bris, punktati, apsces, aspirat gornjeg dišnog trakta, bris kanile, dren, sekret sinusa i bris oko intravaskularnog katetera.

Identifikacija bakterijske vrste svakog izolata provedena je pomoću masenog spektrometra „Bruker MALDI Biotyper” (Bruker Daltonik GmbH, Njemačka). Za

identifikaciju masenom spektrometrijom „MALDI-TOF“ (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) korišten je direktni transfer iz 24-satne kulture. Nakon nanošenja soja na pločicu i sušenja, nanesen je i 1 µL HCCA (α -cijano-4-hidroksicinaminska kiselina) matriksa. Rezultati dobiveni u obliku score-a interpretirani su prema uputi proizvođača: iznad 2.000 se vrši identifikacija na razini vrste, od 1.700 do 1.999 identifikacija na razini roda i rezultat < 1.700 znači bez pouzdane identifikacije. Izolati korišteni u ovom istraživanju pohranjeni su u mediju koji sadrži 300 mL demineralizirane vode, 8.4 g baze za bujon „Brucella“ (Millipore, Merck, Njemačka) i 45 mL glicerola (Fagron, Nizozemska), na temperaturi od - 80 °C do trenutka njihove upotrebe.

3.3. Testiranje antimikrobne osjetljivosti izolata *K. pneumoniae* metodom disk difuzije

Sojevi *K. pneumoniae* se nasade na krvni agari i inkubiraju preko noći na 37 °C. Krvni agar se priredio tako da se dodalo 42 g agar baze („Blood Agar Base No.2“; biolab, Hrvatska) u 950 mL demineralizirane vode, nakon čega se dodalo 50 mL konjske krvi („BIOSAP HCO“; BioGnost, Hrvatska). Sve hranjive podloge korištene u ovom istraživanju su pripremljene pomoću komercijalnih agara koji se dodaju u demineraliziranu vodu, potom steriliziraju te razlijevaju u petrijevke koje se pospremaju na + 4 °C do korištenja.

Iz nekoliko kolonija prekonoćne kulture napravljene su suspenzije bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini optičke gustoće koja odgovara standardu 0.5 McFarlanda (1 McF, $\sim 10^8$ CFU/mL). Osjetljivost na antimikrobne lijekove testirana je na agaru Mueller-Hinton (MH) koji je priređen tako da se 38 g agara („Mueller-Hinton II Agar“; biolab, Hrvatska) doda u jednu litru demineralizirane vode. Bakterijska suspenzija ravnomjerno se nanosi u 3 sloja na agar MH pomoću vatenog štapića, nakon čega se postavljaju diskovi s precizno određenom količinom svakog antibiotika.

Osjetljivost izolata određena je metodom disk-difuzije po Kirby-Baueru za sljedeće antibiotike: ampicilin/amoksicilin (10 µg), amoksicilin+klavulansku kiselinu (20+10 µg), cefaleksin (30 µg), cefuroksim (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), levofloksacin (5 µg), cefpodoksime (10 µg), cefiksime (5 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), trimetoprim+sulfametoksazol (1.25 + 23.75 µg), ceftazidime (10 µg), cefotaksim (5 µg), ceftriakson (30 µg), cefepime (30 µg), piperacilin+tazobaktam (30 + 6 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ceftazidime+avibaktam (10 + 4 µg), ceftolozan + tazobaktam (30 + 10 µg), imipenem+relebaktam (35 µg) i cefiderokol (30 µg) (Oxoid, UK i

BioMaxima, Poljska). Rezultati testiranja osjetljivosti na antibiotike očitani su sljedeći dan, nakon inkubacije na 37 °C, mjerenjem promjera inhibicijskih zona oko diskova u milimetrima. Sojevi su interpretirani kao otporni, intermedijarni ili osjetljivi na pojedine antibiotike (Watts i sur., 2007.). Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove metodom disk-difuzije u skladu je s preporukama Europskog odbora za testiranje antimikrobne osjetljivosti (eng. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST), verzija 14.0 (EUCAST, 2024.).

Otpornost na karbapeneme je u ovom istraživanju definirana otpornošću na ertapenem i prisutnošću karbapenemaza. Indikacije za testiranje na karbapenemaze su: ertapenem < 25 mm; ili imipenem < 22 mm; ili meropenem < 25 mm; ili meropenem 25-27 mm + otpornost na piperacilin + tazobaktam; ili, za probirne uzorke, vidljivi porast na ploči CRE. Za detekciju produkcije pojedine karbapenemaze se potom koristi imunokromatografski test RESIST-5 O.K.N.V.I. (Coris BioConcept, Belgija). Nekoliko kolonija iz prekonoćne kulture stavi se u 11 kapi LY-D pufera, vorteksira (,Vibromix 10“; Tehnica, Domel, Slovenija) te se potom 100 µl doda na imunokromatografsku pločicu. Ako se nakon 15 minuta uz kontrolnu crticu pojavi i crtica za neku od pet karbapenemaza (KPC, IMP, NDM, VIM ili OXA-48), to znači da je test pozitivan na istu, a rezultat se potvrđuje metodom lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i agaroznom gel elektroforezom.

3.4. Testiranje antimikrobne osjetljivosti izolata *K. pneumoniae* metodom mikrodilucije u bujonu

Kod izolata otpornih na ertapenem određena je i najniža koncentracija antibiotika koja sprečava umnažanje testiranog soja, odnosno minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), za imipenem, meropenem i kolistin metodom mikrodilucije u bujonu. Rezultati su također interpretirani prema smjernicama EUCAST-a, verzija 14.0 (EUCAST, 2024.). Prije razrjeđivanja, 20 mg imipenema otopljeno je u 4 mL destilirane vode, nakon čega su 2 mL prenesena u epruvetu s 8 mL bujona, čime je postignuta početna koncentracija od 1024 µg/mL. Zatim je pripremljeno 12 sterilnih epruveta, raspoređenih u četiri serije po tri epruvete. Svaka serija sadržavala je epruvete ispunjene s 2, 3 i 7 mL bujona. Iz epruvete s koncentracijom od 1024 µg/mL uzeti su uzorci od 2, 1 i 1 mL te preneseni u epruvete prve serije. Postupak je ponovljen u preostalim serijama, pri čemu su uzorci u istim volumenima preneseni iz posljednje epruvete prethodne serije u sljedeću seriju, što je rezultiralo razrjeđenjima u rasponu od 512 µg/mL do 0.25 µg/mL (makrodilucija). Kako bi se postigle konačne koncentracije antibiotika, u svaku jažicu dodano je 50 µL bakterijske suspenzije, čime su početne koncentracije

prepolovljene, rezultirajući rasponom od 256 µg/mL do 0.12 µg/mL (mikrodilucija). Meropenem i kolistin razrijeđeni su prema istom postupku, pri čemu je 1 mL početne otopine prenesen u 9 mL bujona, čime je postignuta početna koncentracija od 512 µg/mL. U mikrotitarskim pločicama konačne koncentracije antibiotika kretale su se od 128 µg/mL do 0.125 µg/mL. Potom su pločice zatvorene sterilnim poklopcem te inkubirane u termostatu na 37 °C tijekom 24 sata (Watts i sur., 2007.; Barišić, 2012.). Za kontrolu kvalitete korištena su dva referentna soja: *Escherichia coli* NCTC 13846 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Testirani sojevi inokulirani su u 5 mL MH bujona i inkubirani preko noći na 37 °C, u vodenoj kupelji. Prekonoćna kultura sadržavala je između 10^9 i 10^{10} CFU/mL. Konačna koncentracija od 5×10^5 CFU/mL postignuta je serijskim razrjeđivanjem, pri čemu je 100 µL bakterijske kulture dodano u 9.9 mL fiziološke otopine, čime je dobiveno razrjeđenje od 10^8 CFU/mL. Zatim je 100 µL ovog razrjeđenja preneseno u 9.9 mL MH bujona, čime je postignuta koncentracija od 10^6 CFU/mL. Iz dobivenog razrjeđenja uzeto je 50 µL i dodano u jažice mikrotitarskih pločica koje su već sadržavale 50 µL antibiotika, čime je konačna koncentracija inokuluma iznosila 5×10^5 CFU/mL. Mikrotitarske pločice se potom inkubiraju oko 16-24 h. Minimalna inhibitorna koncentracija određuje se vizualizacijom zamućenosti. Točnije, prva bistra jažica označava MIK, odnosno minimalnu koncentraciju antibiotika koja je dovoljna da ne poraste niti jedna bakterijska kolonija (Watts i sur., 2007.; Barišić 2012.). Sojevi čije su vrijednosti MIK iznad 4 mg/L za imipenem; 8 mg/L za meropenem; i 2 mg/L za kolistin su proglašeni otpornima na navedeni antimikrobni lijek (EUCAST, 2024.).

3.5. Detekcija i karakterizacija gena koji kodiraju za karbapenemaze, sustava CRISPR-Cas i sedam domaćinskih gena izolata *K. pneumoniae*

3.5.1. Izolacija bakterijske DNA

Deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic Acid*, DNA) svih bakterijskih izolata ekstrahirana je metodom vrenja (eng. *Boiling Method*). Bakterijski lizati pripremljeni su iz nekoliko morfološki identičnih bakterijskih kolonija (5-10 µg), resuspendirani u 1 mL ultra-čiste PCR vode („Ambion™ Nuclease-Free Water”; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD), zagrijani na 95 °C na termobloku (Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific, SAD) tijekom 15 minuta te centrifugirani pri 12 000 okretaja dvije minute (Domel, Slovenija). Nakon centrifugiranja, supernatant je korišten kao uzorak za PCR amplifikaciju. 1.5 µl supernatanta analizirano je spektrofotometrijski koristeći „NanoDrop Lite“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) mjerenjem apsorbancije na 260 i 280 nm. Za dovoljno čistu DNA, omjer A_{260}/A_{280} iznosi

između 1.6 i 1.8, dok apsorbancijska vrijednost $A_{260} = 1$ odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50 µg/ml.

3.5.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i agarozna gel elektroforeza

Lančana reakcija polimerazom primijenjena je za detekciju gena otpornosti na karbapeneme, za detekciju gena i lokusa sustava CRISPR-Cas te za tipizaciju sljedova više lokusa (eng. *MultiLocus Sequence Typing*, MLST). Prilikom provedbe PCR-a za detekciju pojedinih karbapenemaza, istovremeno se amplificiralo pet gena pomoću pet parova početnica, uključujući gen za karbapenemazu klase A (*bla_{KPC-2}*), metalo-beta-laktamaze klase B (*bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*) te beta-laktamazu klase D (*bla_{OXA-48}*), kako je ranije opisano (Poirel i sur., 2011.; Wang i sur., 2012.; Watahiki i sur., 2020.). Nasuprot tome, geni *rpoB* i *cas1* te CRISPR lokusi 1, 2 i 3 amplificirani su pojedinačno, pomoću jednog para početnica, *singleplex* PCR metodom kako je navedeno u prethodnim radovima (Diancourt i sur., 2005.; Lin i sur., 2016.; Wang i sur., 2020.).

PCR je prvotno proveden pomoću uređaja „ProFlex 3×32-well PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) u ukupnom volumenu od 20 µL, pri čemu je reakcijska smjesa sadržavala: 1× reaction buffer B, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-ova, 1 jedinicu enzima polimeraze „FIREPol® DNA polymerase“ (Solis BioDyne, Estonija), 600 nM svake početnice (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) te 5 µL genomske DNA kao kalupa. PCR uvjeti uključivali su početnu denaturaciju kalupa DNA i aktivaciju polimeraze pri 95 °C tijekom 4 minute; zatim 30 ciklusa koji su se sastojali od 30 s denaturacije DNA pri 95 °C, 30 s prijanjanja početnica (T_a vrijednosti su prikazane u tablicama 1 i 2) te 2 minute elongacije pri 72 °C pri čemu se sintetizira dvolančana DNA od interesa i završnu elongaciju od 7 minuta pri 72 °C.

PCR za 7 domaćinskih gena izolata *K. pneumoniae* (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* i *tonB*) proveden je pomoću uređaja „Veriti™ Thermal Cycler“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) u Klinici za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević, na Odjelu za bakteriologiju, bolničke infekcije i sterilizaciju (Jelić, 2018.). Ukupni volumen PCR reakcijske smjese, iznosio 9 µL te je za amplifikaciju korišteno 1 µL genomske DNA kao kalup. Sastav reakcijske smjese uključivao je: 1.5 mM MgCl₂ („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka), 1X PCR buffer (50 mM KCl) („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka), 0.2 mM svakog deoksinukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) („Geneamp dNTP blend“, Thermo Fisher Scientific, SAD), početnice u koncentraciji 200 nM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) te 0.05 U HotStart Taq-polimeraze („Hot Start Pol“, Jena Bioscience, Njemačka). PCR je započeo

denaturacijom DNA na 94 °C tijekom dvije minute i 30 sekundi, nakon čega je uslijedila amplifikacija kroz 30 ciklusa. Svaki ciklus sastojao se od denaturacije pri 94 °C, 20 sekundi, temperature sparivanja početnica s kalupom (eng. *annealing temperature*, T_a) definirane pomoću temperature taljenja (eng. *melting temperature*, T_m) (25 sekundi) i elongacije (72 °C) čije je trajanje ovisilo o veličini PCR produkta. Reakcija je završena konačnom elongacijom pri 72 °C (dvije minute). T_m početnica određena je njihovom duljinom i nukleotidnim sastavom (Jelić, 2018.).

Za procjenu T_m -a početnica za gene otpornosti i sustav CRISPR-Cas korišten je program „ T_m Calculator“ (Thermo Fisher Scientific, www.thermofisher.com) uz parametre 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl i koncentraciju početnica od 600 nM, dok je za početnice za MLST korišten program „Beacon Designer“ (PremierBiosoft, www.premierbiosoft.com) uz iste parametre, izuzev koncentracije početnica od 200 nM. T_a je bila 3-5 °C niža od T_m -a, dok je T_a početnica lokusa CRISPR 1, 2 i 3 optimizirana koristeći temperaturni gradijent zbog varijabilne veličine amplikona. Veličina PCR produkta je za sve ostale reakcije unaprijed određena odabranim početnicama, a za izračun duljine amplikona korišten je program NCBI-a „Primer Blast“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Jelić, 2018.). Sve početnice (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) koje su korištene za navedene reakcije, kao i očekivane veličine amplifikacijskih produkata, prikazane su u tablicama od 1 do 3.

PCR produkti analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1.5 %-tnom agaroznom gelu („Agarose BioReagent“, Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka), pripremljenom u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-baza, 1 % v/v ledena octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0) uz dodatak 0.1 %-tne DNA-vezujuće boje („Sybr Safe“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je za prvi dio istraživanja provedena u kadici „VG-SYS Vari-gel Maxi Gel Electrophoresis System“ (SCIE-PLAS, Thermo Fisher Scientific, SAD) pomoću ispravljača „EPS 101“ (Amersham Biosciences, SAD), dok je elektroforeza za drugi dio ispitivanja provedena pomoću „Sub-Cell® Model 96 cell“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) uz izvor napajanja „PowerPac Basic power supply“ (Bio-Rad Laboratories, SAD) pri naponu od 4 V/cm tijekom 90 minuta za prvi dio istraživanja (detekciju gena koji kodiraju karbapenemaze i gena/lokusa sustava CRISPR-Cas), odnosno 60 minuta za analizu MLST (Jelić, 2018.).

Za analizu PCR produkata elektroforezom je korišteno 10 µL amplikona pomiješano s 2 µL boje za nanošenje uzoraka na agarozni gel („Gel loading solution“, Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka), odnosno 6 X pufera za nanošenje uzoraka (0.25 % m/v bromfenol-plava, 0.25 %

m/v ksilen-cijanol, 30 % v/v glicerol) za drugi dio istraživanja. Za procjenu veličine fragmenata DNA za gene *cas1* i *rpoB* primijenjen je standard molekulskih masa od 50 do 1000 pb („mi-Low Range DNA Marker Go“; metabion, Njemačka), za lokuse CRISPR standard veličine od 100 do 5000 pb („O'GeneRuler™ Express DNA Ladder“; Thermo Fisher Scientific, SAD), a za detekciju sedam domaćinskih gena *K. pneumoniae* standard veličine od 100 do 3000 pb („GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific, SAD). PCR produkti (fragmenti DNA) vizualizirani su pod UV svjetlom koristeći „TFX-20.MC“ (Vilber Lourmat, Francuska) te sustav za digitalnu dokumentaciju „OmniDOC“ (Cleaver Scientific, UK).

3.5.3. Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)

Sekvenciranje nukleotida korišteno je za analizu lokusa CRISPR1, 2 i 3 te sedam domaćinskih gena sojeva *K. pneumoniae* kod kojih je sustav CRISPR-Cas prethodno detektiran putem PCR-a kako je opisano u poglavlju 3.5.2. Početnice korištene za amplifikaciju ovih regija prikazane su u tablici 2 i 3. PCR amplifikacija izvedena je u volumenu od 40 µL (30 µL reakcijske smjese i 10 µL bakterijske DNA) za prvi dio istraživanja u KBC-u Zagreb, odnosno 20 µL (18 µL reakcijske smjese i 2 µL bakterijske DNA) za drugi dio istraživanja u Klinici za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević. Reakcija je trajala 35 ciklusa prema uvjetima navedenim u poglavlju 3.5.2., dok je validacija PCR produkata provedena gel elektroforezom (Jelić, 2018.).

Pročišćavanje umnoženih 30 µL PCR produkata lokusa CRISPR izvršeno je pomoću komercijalnog kita za pročišćavanje „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača, a Exo-Sap metodom, uz kombinaciju enzima egzonukleaze I (eng. *Exonuclease I*, Exo) i alkalne fosfataze škampa (eng. *Shrimp Alkaline Phosphatase*, SaP), su pročišćeni amplikoni za MLST. Reakcijski volumen od 3.75 µL sadržavao je 1 U alkalne fosfataze škampa („FastAP™“, Thermo Fisher Scientific, SAD), 5 U egzonukleaze I („Exonuclease I“, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 2.5 µL PCR produkta. Pročišćavanje je provedeno na uređaju „Veriti™ Thermal Cycler“ kroz enzimski tretman pri 37 °C tijekom 20 minuta, nakon čega je enzimska inaktivacija izvedena na 80 °C tijekom 15 minuta, uz završno hlađenje na 4 °C. Reakcijski produkti razrijeđeni su dodatkom 15 µL sterilne ultra-čiste vode („Nuclease-Free Water“; Qiagen, Njemačka).

Amplificirani i pročišćeni produkti PCR lokusa CRISPR1, 2 i 3 sekvencirani su u servisu Macrogen Europe BV, u Nizozemskoj. Identifikacija lokusa CRISPR provedena je korištenjem algoritma CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) koji prepoznaje direktne ponavljajuće sekvence duljine 23-55

bp, razdvojene varijabilnim sekvencama (razmaknicama) duljine 25-60 bp. Lokusi CRISPR klasificirani su prema razini dokaza (eng. *evidence level*) od 1 do 4. Razina 1 uključuje kratke sekvence lokusa CRISPR (s tri ili manje razmaknica), dok se razine 2 do 4 određuju na temelju sličnosti direktnih ponavljanja i razmaknica. U analizu su uključeni samo potvrđeni CRISPR lokusi, svrstani u razine 2, 3 ili 4. Svaka jedinstvena razmaknica dodatno je analizirana pretraživanjem u bazi podataka GenBank-a pomoću algoritma BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch).

Sekvenciranje u sklopu analize MLST je provedeno pomoću specifičnih početnica za gene od interesa koristeći komplet reagensa „ABI PRISM BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific, SAD). Svaka reakcija za sekvenciranje je u volumenu od 3 µL sadržavala 1.6 pM početnice, 0.6 µL „BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix-a“, 0.3 µL „5 X Sequencing Buffer-a“ i 1 µL pročišćenog PCR produkta. Sekvenciranje je provedeno na uređaju „Veriti™ Thermal Cycler“ prema preporučenom protokolu: početna denaturacija DNA na 96 °C jednu minutu, zatim 25 ciklusa koji uključuju (a) denaturaciju na 96 °C (10 sekundi), (b) prijanjanje početnica na 50 °C (pet sekundi) i (c) elongaciju na 60 °C (četiri minute), uz završno hlađenje na 4 °C (Jelić, 2018.).

Nakon sekvenciranja, produkti reakcije su pročišćeni metodom precipitacije etanolom, natrijevim acetatom i EDTA. Svakom uzorku je dodano 9.3 µL otopine koja sadrži 0.3 µL 125 mM EDTA, 0.3 µL 3M natrijevog acetata i 8.7 µL 96 %-tnog etanola. Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi (15 minuta), produkti reakcije su centrifugirane pri $2000 \times g$ tijekom 35 minuta, a supernatant je uklonjen. Ispiranje se izvršilo dodatkom 15 µL 70 %-tnog etanola te ponovnim centrifugiranjem pri $1650 \times g$ (15 minuta). Konačni produkt otopljen je u 20 µL deioniziranog formamida („Hi-Di Formamide“, Thermo Fisher Scientific, SAD). Analiza sekvenciranih nukleotida provedena je na uređaju „ABI Prism® 310 Genetic Analyzer“ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača, koristeći 10 µL prethodno pročišćenog produkta. Dobivene sekvence sastavljene su pomoću računalnog programa „DNA Baser“ (Heracle BioSoft S.R.L., Rumunjska), dok su varijante gena identificirane analizom DNA sekvenci putem baze podataka Instituta Pasteur, namijenjene za analizu MLST sojeva *K. pneumoniae* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) (Jelić, 2018.).

3.6. Molekularna epidemiologija

3.6.1. Gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (PFGE)

Genetička srodnost izolata *K. pneumoniae* analizirana je gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju (eng. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) koristeći ukupnu bakterijsku DNA razgrađenu restrikcijskim enzimom XbaI prema standardiziranom Pulsenet protokolu za genotipizaciju enterobakterija (Kitchel i sur., 2009.; Jelić, 2018.). Iz bakterijskih kolonija izolata uzgojenih na krvnom agaru pripremljene su bakterijske suspenzije optičke gustoće 4.0 McF. Nakon centrifugiranja ($7500 \times g$, pet minuta), talog je resuspendiran u 150 μL pufera (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) i inkubiran na 55 °C tijekom 10 minuta. Potom je dodano 20 μL proteinaze K (Qiagen, Njemačka) uz dodatnu inkubaciju na 55 °C tijekom dvije minute. Dobiveni bakterijski lizat pomiješan je s 170 μL otopljene agaroze niskog tališta („Agarose Low Melting“, Eurobio, Francuska; 1.5 % m/v u 1 X TE puferu, 1 % m/v natrijev dodecil-sulfat) temperirane na 50 °C. Nakon pažljivog miješanja agaroze niskog tališta i bakterijskog lizata pipetom, izrađeni su agarozni blokovi korištenjem kalupa („Reusable plug mold“, Bio-Rad Laboratories, SAD), koji su zatim polimerizirani hlađenjem na 4 °C tijekom 10 minuta. Blokovi agaroze s bakterijskom DNA su prebačeni u polipropilenske epruvete za centrifugu od 50 mL (Corning, SAD) i inkubirani su u puferu za lizu (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1 % m/v lauroil sarkozin) s 20 μL proteinaze K pri 54 °C tijekom dva sata. Nakon uklanjanja pufera, blokovi su isprani dva puta sterilnom ultračistom vodom i tri puta 1 X TE puferom (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) pri 50 °C. Svaka inkubacija je trajala 15 minuta uz trešnju od 50 rpm-ova. Pročišćeni agarozni blokovi su potom pohranjeni u 5 mL 1 X TE pufera i čuvani u polipropilenskim epruvetama za centrifugu volumena 50 mL na 4 °C do daljnje uporabe (Kitchel i sur., 2009.; Jelić, 2018.).

Od svakog agaroznog bloka se odrezao fragment specifičnih dimenzija koji se koristio u daljnjoj obradi, nakon čega su se fragmenti inkubirali u 100 μL 1 X Tango pufera (Thermo Fisher Scientific, SAD) na 37 °C tijekom 30 minuta. Potom je ukupna bakterijska DNA razgrađena enzimom XbaI pri 37 °C tijekom dva sata i 30 minuta. Razgradnja je prekinuta uklanjanjem restrikcijskog pufera (20 U XbaI + 100 μL 1 X pufera Tango; Thermo Fisher Scientific, SAD) i dodavanjem 100 μL 1 X TE pufera. Agarozni blokovi s pocijepanom bakterijskom DNA i standard molekulskih masa („CHEF DNA Size Standard“, Bio-Rad Laboratories, SAD) nanoseni su na odgovarajuće pozicije na plastičnom češlju nakon čega su postavljeni u kalup za izradu agaroznog gela. Zatim je dodan 1.0 %-tni agarozni gel za

elektroforezu u izmjeničnom električnom polju („Pulsed Field Certified™ Agarose“, Bio-Rad Laboratories, SAD) otopljen u sterilnom 0.5 X TBE puferu (45 mM Tris-baza, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0) na 55 °C (Jelić, 2018.). Elektroforeza je izvedena u izmjeničnom električnom polju pomoću sustava „CHEF-DR® III“ (Bio-Rad Laboratories, SAD), prema modificiranom Pulsenet protokolu: napon = 6 V/cm; kut električnog polja = 120°; vrijeme pulsa = 6-36 s; pri 14 °C, u trajanju od 19 sati. DNA je vizualizirana inkubacijom gela u 300 mL vodene otopine 0.1 %-tne Sybr® Safe DNA-vezujuće boje (Thermo Fisher Scientific, SAD). Obojeni gelovi, točnije fragmenti DNA, su vizualizirani UV-svjetlošću pomoću sustava „Genebox“ (Syngene, UK). Izolati su svrstani u istu grupu PFGE ako nisu imali više od šest razlika u makrorestriksijskim profilima ukupne genomske DNA (Tenover i sur., 1995.; Han i sur., 2013.; Jelić, 2018.).

3.6.2. Tipizacija sljedova više lokusa (MLST) izolata *K. pneumoniae*

Metoda MLST korištena je za tipizaciju izolata *K. pneumoniae* kako bi se odredila njihova klonalna povezanost. Za svaki pulsotip dobiven analizom PFGE odabran je reprezentativni izolat metodom nasumičnog uzorka, a tipizacija je provedena prema prethodno standardiziranom protokolu (Brisse i sur., 2009.; Jelić, 2018.). Analizirano je sedam konstitutivnih, domaćinskih gena (eng. *housekeeping genes*):

rpoB – beta podjedinica RNA polimeraze;

gapA – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza;

mdh – malat dehidrogenaza;

pgi – glukoza-6-fosfat izomeraza;

phoE – fosfoporinski protein;

infB – inicijacijski faktor IF-2;

tonB – receptor TonB.

Amplifikacija gena provedena je PCR-om, a dobiveni PCR produkti analizirani su elektroforezom u 1.5 %-tnom agaroznom gelu kako je opisano u poglavlju 3.5.3. Nakon provjere uspješnosti amplifikacije, PCR produkti su pročišćeni i pripremljeni za sekvenciranje. Podaci sekvenciranja obrađeni su prema protokolima navedenim u poglavljima 3.5.2 i 3.5.3.. Dobivene sekvence analizirane su usporedbom s bazom podataka Instituta Pasteur, a kombinacija alelnih varijanti sedam analiziranih gena definirana je kao sekvencijski tipovi (ST-

ovi). Svakom izolatu dodijeljena je odgovarajuća grupa ST na temelju kombinacije alela. Za dodatnu filogenetsku analizu i identifikaciju klonskih kompleksa korišten je program eBURST, verzija 3, koji omogućava grupiranje ST-ova u klonske komplekse temeljem zajedničkih alelnih profila što daje uvid u evolucijske odnose između izolata i njihovu moguću epidemiološku povezanost (Spratt i sur., 2004.; Jelić, 2018.).

3.7. *String* test

Fenotip hipermukoviskoznosti (HMV) poznat je kao značajan faktor virulencije kod bakterije *K. pneumoniae* koji je karakterističan po pojačanoj proizvodnji polisaharida povezanih s genima virulencije *rmpA/rmpA2*, što se može potvrditi jednostavnom metodom – *string* testom. Pozitivan *string* test definiran je kao stvaranje viskozne niti duljine > 5 mm na krvnom agaru (Slika 8.) (Hagiya i sur., 2014.; Neumann i sur., 2023.). *String* test je napravljen za sve CRISPR-Cas pozitivne izolate *K. pneumoniae*, uključene u ovo istraživanje, kako bi se utvrdilo javlja li se hipermukoviskoznost kod ispitivanih kliničkih izolata, i ako se javlja, je li u korelaciji s pojavom fenotipa otpornosti na karbapeneme i/ili prisutnošću sustava CRISPR-Cas.



Slika 8. Prikaz stvaranja niti istezanjem kolonija soja *K. pneumoniae* izoliranih iz urina bolesnika.

3.8. Prikupljanje arhivskih podataka

U zadnjoj fazi istraživanja prikupljali su se arhivski podaci o pacijentima od kojih potječu izolati (dob, dijabetes, hipertenzija, maligne bolesti, boravak u jedinici intenzivnog liječenja i mortalitet unutar 30 dana) pohranjeni u bolničkom informatičkom sustavu (BIS) i podaci o izolatima (datum primitka uzorka, vrsta kliničkog uzorka, odjel i osjetljivost na antimikrobne lijekove) iz laboratorijskog informatičkog sustava (LIS) Kliničkog bolničkog Centra Zagreb. Budući da se eksperimentalni dio istraživanja provodio na bakterijskim izolatima te bolesnici nisu bili podvrgnuti nikakvim dodatnim pretragama za potrebe predloženog istraživanja, informirani pristanak ispitanika u istraživanju nije bio potreban. Istraživanjem je provedena analiza podataka prikupljenih tijekom rutinskih dijagnostičkih postupaka kod bolesnika koji nisu podvrgnuti invazivnim dijagnostičko-terapeutskim zahvatima od strane istraživača, niti bilo kakvim dodatnim pretragama za potrebe predloženog istraživanja. U istraživanju se također ne spominju imena i prezimena ispitanika, kao ni njihovi inicijali, spol i godina rođenja, a analiziraju se samo rezultati prikupljeni tijekom rutinskog rada Kliničkog zavoda za kliničku mikrobiologiju, prevenciju i kontrolu infekcija.

3.9. Statistička analiza

Svi izolati bakterije *K. pneumoniae* kategorizirani su kao CRISPR-Cas pozitivni ili negativni te je uspoređivana prisutnost sustava CRISPR-Cas s kliničkim karakteristikama, bolničkim odjelima, tipom uzorka, genima koji kodiraju za karbapenemaze, osjetljivošću na antimikrobne lijekove te skupinama sekvencijskih tipova. Za statističku analizu korišteni su hi-kvadrat test i Fisher-ov egzaktni test. Sve p-vrijednosti su dvostrane, a statistička značajnost definirana je kao $p < 0.05$. Distribucija lokusa CRISPR analizirana je primjenom logističke regresije, dok je za usporedbu dobi među grupama korišten test Mann-Whitney. Statistička analiza provedena je pomoću „MedCalc Statistical Software“, verzija 20.0.4 (MedCalc Software Ltd, Belgija). Prilikom usporedbe dvije ili više skupina, uz p-vrijednost, prikazan je i omjer izgleda ili koeficijent izgleda (eng. *Odds Ratio*, OR). To je statistička mjera koja pokazuje kolika je vjerojatnost (izgled) da se neki događaj dogodi u jednoj skupini u usporedbi s drugom.

- Vrijednost $OR > 1$ sugerira da je pojava koju se ispituje češća u ispitivanoj skupini.
- Vrijednost $OR < 1$ sugerira da je pojava rjeđa.
- Vrijednost $OR = 1$ znači da nema razlike između skupina.

Uz vrijednost OR se prikazuje i interval pouzdanosti (eng. *Confidence Interval*, CI). To je raspon vrijednosti unutar kojeg se, s određenom razinom sigurnosti (npr. 95 %), nalazi stvarna vrijednost OR-a u cjelokupnoj populaciji. Ako CI ne uključuje broj 1, rezultat se smatra statistički značajnim, što potvrđuje i p-vrijednost koja je u tom slučaju manja od 0.05.

4. REZULTATI

4.1. Izolati *K. pneumoniae* i kliničke karakteristike bolesnika

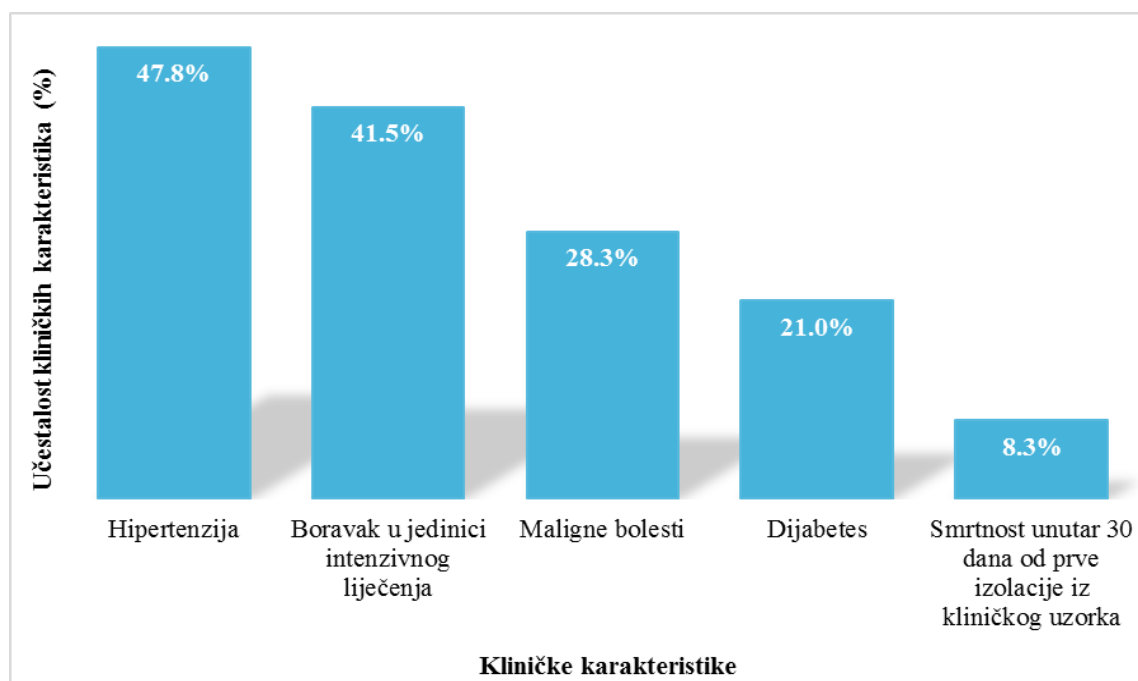
U ovoj retrospektivnoj studiji, provedenoj od siječnja 2021. godine do travnja 2024. godine, prikupljeno je ukupno 400 različitih sojeva bakterije *K. pneumoniae* za koje je masena spektrometrija „MALDI-TOF“ dala pouzdane rezultate identifikacije na razini (≥ 2.000). Bakterijski sojevi su izolirani iz uzoraka urina ($n = 153$, 38.3 %), brisa rektuma ($n = 71$, 17.8 %), stolice ($n = 37$, 9.3 %), brisa ždrijela ($n = 25$, 6.3 %), hemokulture ($n = 21$, 5.3 %), brisa rane ($n = 15$, 3.8 %), aspirata traheje ($n = 15$, 3.8 %), bronhoalveolarnog lavata ($n = 14$, 3.5 %), iskašljaja ($n = 13$, 3.3 %), intraoperativnog uzorka ($n = 9$, 2.3 %), brisa nazofarinksa ($n = 6$, 1.5 %), brisa prepone ($n = 5$, 1.3 %), uzorka ascitesa ($n = 3$, 0.8 %), perianalnog brisa ($n = 3$, 0.8 %), brisa aksile ($n = 2$, 0.5 %), punktata ($n = 2$, 0.5 %) te ostalih uzoraka – apscesa, aspirata gornjih dišnih puteva, brisa kanile, sadržaja drena, sekreta sinusa i briseva intravaskularnog katetera ($n = 6$, 1.5 %). U istraživanje je uključeno ukupno 89 odjela Kliničkog bolničkog Centra Zagreb, koji su svrstani u 14 skupina pri čemu je najveći broj uzoraka bolesnika dobiven s internističkih odjela (INT) te pedijatrijskih i kirurških jedinica intenzivnog liječenja (PJIL; KJIL) (Tablica 4.).

Tablica 4. Distribucija prikupljenih kliničkih uzoraka s obzirom na bolnički odjel ($n = 400$).

Bolnički odjel	Broj uzoraka (%)
Internistički odjeli	64 (16.0)
Internističke jedinice intenzivnog liječenja	57 (14.3)
Pedijatrijske jedinice intenzivnog liječenja	51 (12.8)
Kirurške jedinice intenzivnog liječenja	45 (11.3)
Kirurški odjeli	44 (11.0)
Vanjski bolesnici	40 (10.0)
Hematološki odjeli	25 (6.3)
Pulmološki odjeli	23 (5.8)
Hitna služba	21 (5.3)
Jedinice intenzivnog liječenja za COVID-19 bolesnike	12 (3.0)
Pedijatrijski odjeli	9 (2.3)
Onkološki odjeli	6 (1.5)
Odjeli za COVID-19 bolesnike	3 (0.8)

Od ukupno 400 sojeva *K. pneumoniae*, 206 (51.5 %) je izolirano iz uzoraka muškaraca, a 194 (48.5 %) iz uzoraka žena, s medijanom dobi od 62 godine (0-90). Analiza pet kliničkih karakteristika bolesnika pokazala je da je hipertenzija je zabilježena kod najvećeg broja

bolesnika, odnosno kod njih 191 (47.8 %), boravak u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) kod 166 bolesnika (41.5 %), maligne bolesti kod 113 (28.3 %), a dijabetes kod 84 bolesnika (21.0 %). Unutar 30 dana od prvog pozitivnog uzorka na bakteriju *K. pneumoniae* zabilježena je smrtnost od 8.3 % (33/400) (Slika 9.).



Slika 9. Učestalost pet kliničkih karakteristika kod bolesnika s izoliranom bakterijom *K. pneumoniae* iz različitih kliničkih uzoraka.

4.2. Antimikrobna osjetljivost izolata *K. pneumoniae*

Osjetljivost bakterijskih izolata ispitana je na 24 različita antimikrobna lijeka svrstana u 15 različitih skupina (Tablica 5.). Nisu svi bakterijski izolati ispitani na sva 24 antimikrobna lijeka jer se ispitivanje antimikrobne osjetljivosti počinje s antimikrobnim lijekovima užeg spektra djelovanja (red I) te se postepeno širi na one šireg spektra djelovanja (red II, odnosno red III) ako to zahtijeva stupanj otpornosti pojedinog izolata.

Tablica 5. Klasifikacija testiranih antimikrobnih lijekova (n = 24) u 16 različitih grupa.

Klasa antimikrobnog lijeka	Antimirobni lijek
Penicilini (aminopenicilini)	Ampicilin/amoksisilin
Kombinacija penicilina i inhibitora beta-laktamaza	Amoksisilin + klavulanska kiselina
Kombinacija antipseudomonasnog penicilina i inhibitora beta-laktamaza	Piperacilin + tazobaktam
Cefalosporin 1. generacije	Cefaleksin
Cefalosporin 2. generacije	Cefuroksim
Cefalosporini 3. generacije	Cefiksim, cefpodoksim, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim
Cefalosporin 4. generacije	Cefepim
Sideroforni cefalosporin	Cefiderokol
Kombinacija cefalosporina 3. generacije i inhibitora beta-laktamaza	Ceftazidim + avibaktam
Kombinacija cefalosporina 5. generacije i inhibitora beta-laktamaza	Ceftolozan + tazobaktam
Karbapenemi	Ertapenem, imipenem, meropenem
Kombinacija karbapenema i inhibitora beta-laktamaza	Imipenem + relebaktam
Aminoglikozidi	Gentamicin, amikacin
Fluorokinoloni	Ciprofloksacin, levofloksacin
Kombinacija diaminopirimidina i sulfonamida	Trimetoprim + sulfametoksazol
Polimiksin	Kolistin

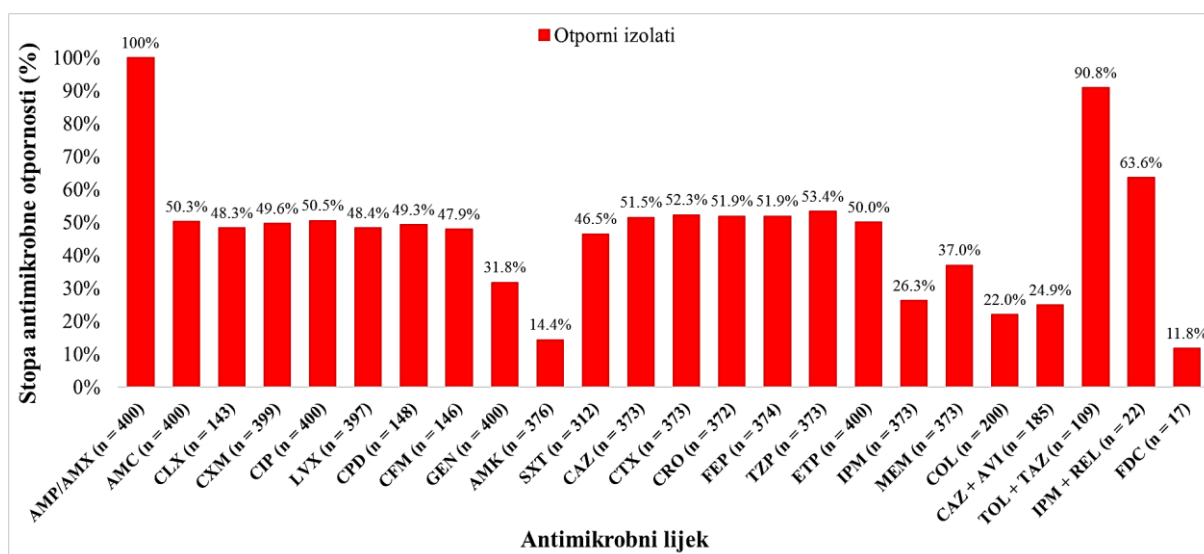
Intermedijarno osjetljivi i osjetljivi sojevi su klasificirani kao sojevi osjetljivi na testirani antimikrobni lijek. Najviša razina otpornosti bakterija je zabilježena za aminopeniciline ampicilin/amoksisilin (100 %) na koji su sojevi *K. pneumoniae* intrinzično otporni, dok su izolati imali najniže stope otpornosti na sideroforni cefalosporin – cefiderokol (11.8 %), aminoglikozid – amikacin (14.4 %) i polimiksin – kolistin (22.0 %). Stope otpornosti na ertapenem, meropenem i imipenem iznosile su 50.0 %, 37.0 % i 26.3 %, redom (Tablica 6., Slika 10.). Na osnovu zabilježene otpornost izolata na ertapenem, uz detekciju barem jednog gena *bla* koji kodira za karbapenemazu, izolati su svrstani u skupinu sojeva *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme (eng. *carbapenem-resistant K. pneumoniae*, CRKp) (50.0 %). Preostalih 200 izolata (50.0 %) je bilo osjetljivo na sva tri karbapenema te kod istih nije

detektiran neki od karbapenemaznih gena *bla*, stoga su svrstani u skupinu sojeva *K. pneumoniae* osjetljivih na karbapeneme (eng. *carbapenem-susceptible K. pneumoniae*, CSKp). Svi izolati CRKp uključeni u ovu studiju spadaju u sojeve MDR. Preciznije, izolati CRKp su zadovoljavali kriterij višestruke otpornosti, odnosno otpornosti na barem jedan antibiotik iz minimalno tri različite klase antibiotika, ne uzimajući u obzir intrinzičku otpornost sojeva *K. pneumoniae* na ampicilin/amoksisicilin. Oznaka ampicilin/amoksisicilin u kontekstu disk difuzijskog testa znači da se osjetljivost na amoksisicilin zaključuje na temelju rezultata dobivenog testiranjem ampicilina. Za sve antimikrobne lijekove su u tablici 6. i na slici 10. prikazani rezultati dobiveni metodom disk difuzije, osim u slučaju 200 sojeva CRKp gdje su rezultati za imipenem, meropenem i kolistin dobiveni na osnovu vrijednosti MIK.

Tablica 6. Prikaz ukupnog broja osjetljivih i otpornih izolata bakterije *K. pneumoniae* na pojedine antimikrobne lijekove (n = 24).

Antimikrobni lijek (n)	Broj osjetljivih izolata (%)	Broj otpornih izolata (%)
Ampicilin/amoksisicilin (n = 400)	0 (0)	400 (100)
Amoksisicilin + klavulanska kiselina (n = 400)	199 (49.8)	201 (50.3)
Cefaleksin (n = 143)	74 (51.7)	69 (48.3)
Cefuroksim (n = 399)	201 (50.4)	198 (49.6)
Ciprofloksacin (n = 400)	198 (49.5)	202 (50.5)
Levofloksacin (n = 397)	205 (51.6)	192 (48.4)
Cefpodoksime (n = 148)	75 (50.7)	73 (49.3)
Cefiksime (n = 146)	76 (52.1)	70 (47.9)
Gentamicin (n = 400)	273 (68.2)	127 (31.8)
Amikacin (n = 376)	322 (85.6)	54 (14.4)
Trimetoprim + sulfametoksazol (n = 312)	167 (53.5)	145 (46.5)
Ceftazidime (n = 373)	181 (48.5)	192 (51.5)
Cefotaksim (n = 373)	178 (47.7)	195 (52.3)
Ceftriakson (n = 372)	179 (48.1)	193 (51.9)
Cefepime (n = 374)	180 (48.1)	194 (51.9)
Piperacilin + tazobaktam (n = 373)	174 (46.6)	199 (53.4)
Ertapenem (n = 400)	200 (50.0)	200 (50.0)
Imipenem* (n = 373)	275 (73.7)	98 (26.3)
Meropenem* (n = 373)	235 (63.0)	138 (37.0)
Kolistin* (n = 200)	156 (78.0)	44 (22.0)
Ceftazidime + avibaktam (n = 185)	139 (75.1)	46 (24.9)
Ceftolozan + tazobaktam (n = 109)	10 (9.2)	99 (90.8)
Imipenem + relebaktam (n = 22)	8 (36.4)	14 (63.6)
Cefiderokol (n = 17)	15 (88.2)	2 (11.8)

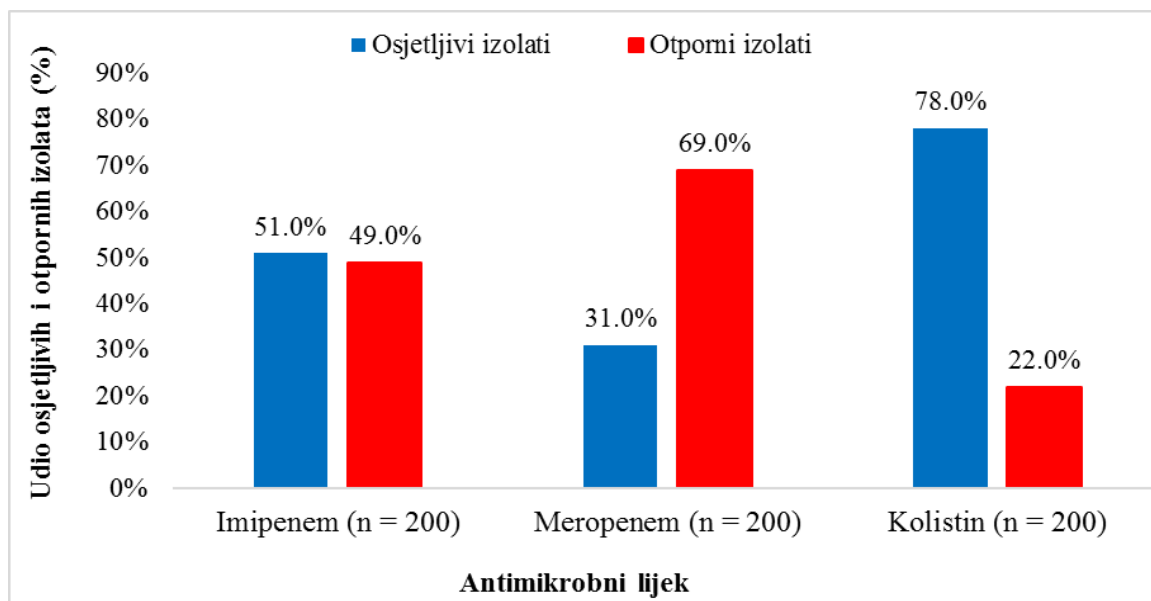
* – antibiotik za koji je profil osjetljivosti za 200 sojeva CRKp određen vrijednostima MIK dobivenim mikrodilucijskom metodom



Slika 10. Prikaz stope otpornosti izolata bakterije *K. pneumoniae* na 24 različita antimikrobna lijeka. AMP/AMX – ampicilin/amoksicilin, AMC – amoksicilin + klavulanska kiselina, CLX – cefaleksin, CXM – cefuroksim, CIP – ciprofloksacin, LVX – levofloksacin, CPD – cefpodoksim, CFM – cefiksime, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, SXT – trimetoprim + sulfametoksazol, CAZ – ceftazidim, CTX – cefotaksim, CRO – ceftriakson, FEP – cefepim, TZP – piperacilin + tazobaktam, ETP – ertapenem, IPM – imipenem, MEM – meropenem, COL – kolistin, CAZ + AVI – ceftazidim + avibaktam, TOL + TAZ – ceftolozan + tazobaktam, IPM + REL – imipenem + relebaktam, FDC – cefiderokol.

Nove kombinacije beta-laktama i inhibitora beta-laktamaza, uključujući ceftazidim + avibaktam, ceftolozan + tazobaktam, imipenem + relebaktam, uz kolistin i cefiderokol, ispitane su samo za sojeve CRKp koji su pokazali stope otpornosti od 90.8 % za ceftolozan + tazobaktam, 63.6 % za imipenem + relebaktam i 24.9 % za ceftazidim + avibaktam. Sojevi *K. pneumoniae* imali su najniže stope otpornosti na cefiderokol (11.8 %), potom amikacin (14.4 %), kolistin (22.0 %), ceftazidim + avibaktam (24.9 %), imipenem (26.3 %) i gentamicin (31.8 %). Svi ostali testirani antimikrobni lijekovi, izuzev ampicilina/amoksicilina, kombinacije ceftolozana + tazobaktama i imipenema + relebaktama, pokazuju stope otpornosti od 46.5 % do 53.4 % (Tablica 6., Slika 10.).

Za sve sojeve koji su metodom disk difuzije pokazali otpornost na jedan ili više karbapenema (n = 200), su metodom mikrodilucije određene vrijednosti MIK u rasponu od 0.125 do 128 µg/ml za imipenem, meropenem i kolistin. Najveća otpornost izolata CRKp je zabilježena za meropenem (69.9 %), a najmanja za kolistin (22.0 %) (Slika 11.).



Slika 11. Prikaz vrijednosti MIK za imipenem, meropenem i kolistin kod izolata *K. pneumoniae* otpornih na barem jedan karbapenem (n = 200).

4.3. Otpornost izolata na karbapeneme s obzirom na vrstu uzorka i kliničke karakteristike bolesnika

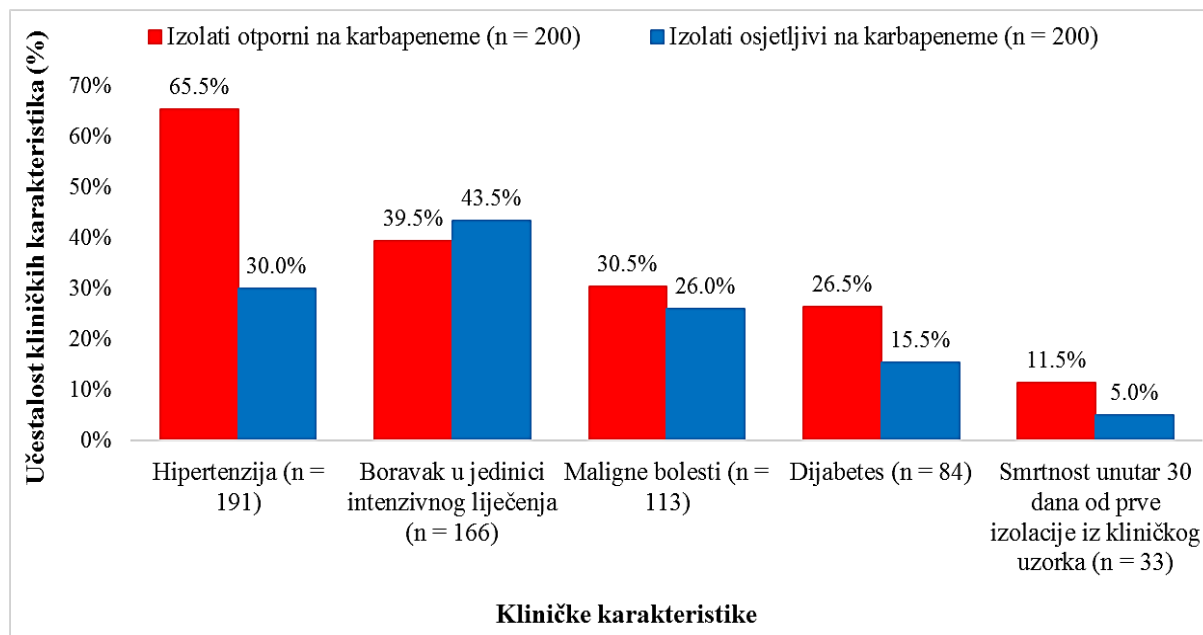
Medijan dobi bolesnika kod kojih su izolirani sojevi CRKp bio je 66.5 godina (0-92), a kod onih s izoliranim sojevima CSKp 50.5 godina (0-92), pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0.0001$). 31.5 % sojeva CSKp izolirano je iz uzoraka novorođenčadi. Sojevi CRKp su češće izolirani iz briseva rektuma (74.6 %) u usporedbi sa sojevima CSKp (25.4 %). Nasuprot tome, sojevi CSKp češće su izolirani iz briseva ždrijela (10.5 %) u odnosu na izolate CRKp (2.0 %) (Tablica 8.).

Tablica 8. Usporedba izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme prema distribuciji u različitim kliničkim uzorcima.

Vrsta uzorka	Ukupan broj (%)	Broj izolata osjetljivih na karbapeneme (%)	Broj izolata otpornih na karbapeneme (%)
Urin	153 (38.3)	73 (36.5)	80 (40)
Bris rektuma	71 (17.8)	18 (9.0)	53 (26.5)
Stolica	37 (9.3)	19 (9.5)	18 (9.0)
Bris ždrijela	25 (6.3)	21 (10.5)	4 (2.0)
Hemokultura	21 (5.3)	9 (4.5)	12 (6.0)
Bris rane	15 (3.8)	5 (2.5)	10 (5.0)
Aspirat traheje	15 (3.8)	10 (5.0)	5 (2.5)
Bronhoalveolarni lavat	14 (3.5)	12 (6.0)	2 (1.0)
Iskašljaj	13 (3.3)	12 (6.0)	1 (0.5)
Intraoperativni uzorak	9 (2.3)	5 (2.5)	4 (2.0)
Bris nazofarinksa	6 (1.5)	6 (3.0)	0 (0)
Bris prepone	5 (1.3)	2 (1.0)	3 (1.5)
Ascites	3 (0.8)	0 (0)	3 (1.5)
Perianalni bris	3 (0.8)	3 (1.5)	0 (0)
Bris pazuha	2 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
Punktat	2 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)
Apsces	1 (0.3)	0 (0)	1 (0.5)
Aspirat gornjeg respiratornog trakta	1 (0.3)	1 (0.5)	0 (0)
Bris kanile	1 (0.3)	1 (0.5)	0 (0)
Dren	1 (0.3)	0 (0)	1 (0.5)
Sekret sinusa	1 (0.3)	1 (0.5)	0 (0)
Bris oko intravaskularnog katetera	1 (0.3)	0 (0)	1 (0.5)
Σ	400 (100)	200 (50)	200 (50)

Učestalost hipertenzije bila je statistički značajno veća kod bolesnika kod kojih su detektirani izolati CRKp (131/200, 65.5 %) u usporedbi s bolesnicima s CSKp (60/200, 30.0 %) ($p < 0.0001$). Kod bolesnika s izolatima CRKp učestalost boravka u JIL-u, malignih bolesti, dijabetesa te 30-dnevna smrtnosti iznosila je, redom, 39.5 % (79/200), 30.5 % (61/200), 26.5 % (53/200) i 11.5 % (23/200). S druge strane, kod bolesnika s izoliranim sojevima CSKp, ove vrijednosti su bile statistički značajno niže, za dijabetes (31/200, 15.5%; $p = 0.007$) i 30-dnevnu smrtnost (10/200, 5.0 %; $p = 0.0183$), dok se učestalost malignih bolesti nije statistički značajno razlikovala (52/200, 26.0 %; $p = 0.3181$). Suprotno tome, učestalost boravka u JIL-u bila je viša

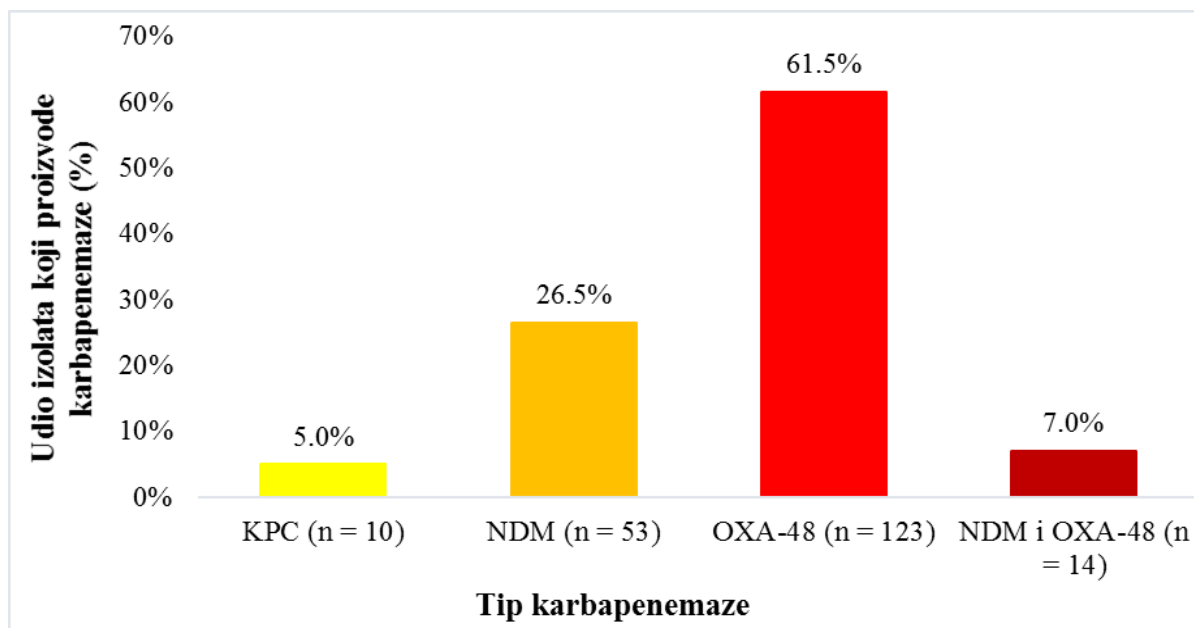
kod bolesnika s izolatima CSKp (87/200, 43.5 %; $p = 0.4175$) (Slika 12.). Ova diskrepancija se može pripisati velikom broju sojeva CSKp izoliranih iz uzoraka novorođenčadi s PJIL-a.



Slika 12. Učestalost kliničkih karakteristika kod bolesnika s izoliranom bakterijom *K. pneumoniae* s obzirom na osjetljivosti izolata na karbapeneme.

4.4. Distribucija gena *bla* koji kodiraju za karbapenemaze kod izolata *K. pneumoniae* i povezanost s otpornošću na karbapeneme

Nakon što je za 200 izolata utvrđena otpornost na barem jedan karbapenem, napravljen je imunokromatografski test koji je kod svakog od 200 izolata utvrdio produkciju barem jedne od tri vrste karbapenemaza (KPC, NDM i/ili OXA-48). Potom je metodom *multiplex* PCR potvrđena prisutnost gena *bla* pri čemu je gen *bla*_{OXA-48} bio najčešći budući da je detektiran kod 123 izolata (61.5 %, 123/200). Gen *bla*_{NDM} je otkriven kod 53 izolata (26.5 %, 53/200), kombinacija gena *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} detektirana je kod 14 izolata (7.0 %, 14/200), dok je gen *bla*_{KPC} bio prisutan kod 10 sojeva (5.0 %, 10/200) (Slika 13.). Zanimljivo je da je najveći broj izolata CRKp koji produciraju KPC iz 2021. godine (10/10, 100 %), onih koji produciraju NDM iz 2022. godine (31/53, 58.5 %) te onih koji produciraju OXA-48 i kombinaciju NDM i OXA-48 iz 2023. i 2024. godine (91/137, 73.0 %).

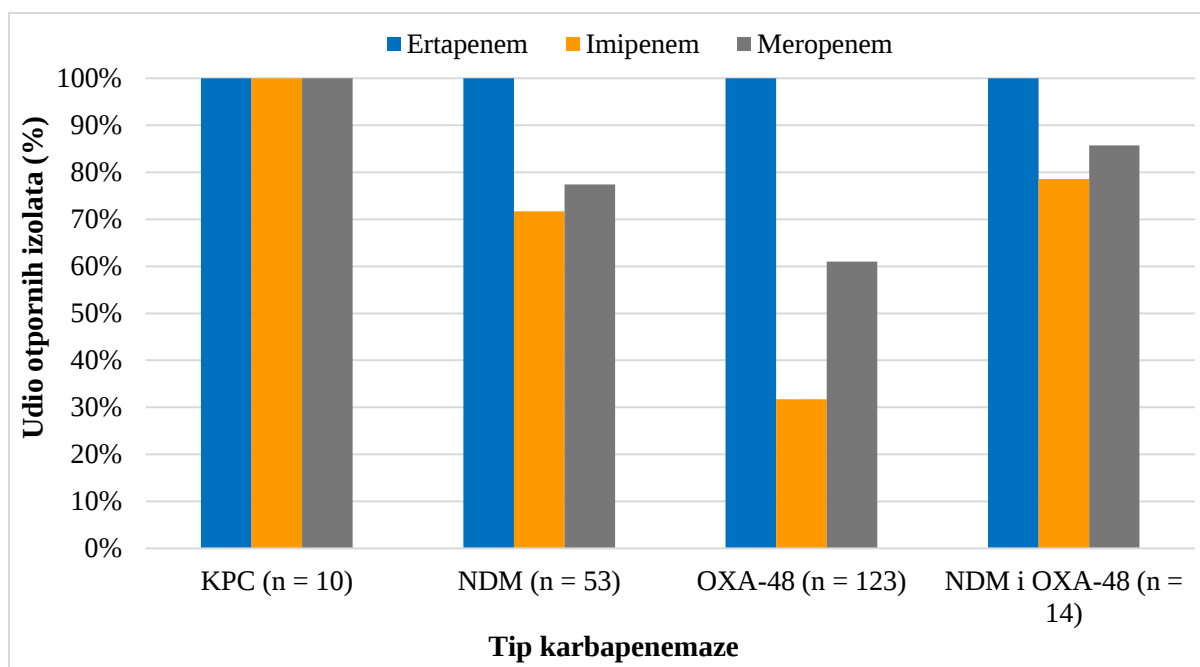


Slika 13. Udio izolata *K. pneumoniae* s obzirom na vrstu karbapenemaze koju proizvode.

Izolati CRKp koji su proizvodili karbapenemaze ispoljavali su varijabilnu fenotipsku otpornost na karbapeneme ovisno o vrsti karbapenemaze koju proizvode. Svih 200 izolata koji nose gen *bla* za neku od karbapenemaza su bili otporni na ertapenem (100 %, 200/200). Od toga je 138 izolata (69.0 %, 138/200) bilo otporno na meropenem, a 98 izolata (49.0 %, 98/200) na imipenem. Svi izolati koji su otporni na ertapenem i imipenem su bili otporni i na meropenem (99.0 %, 97/98), osim jednog soja koji nosi gen *bla*_{OXA-48}. Najviša razina otpornosti na imipenem i meropenem zabilježena je među izolatima koji proizvode KPC (100 %) i kombinaciju karbapenemaza NDM i OXA-48 (imipenem – 78.6 %; meropenem – 85.7 %), dok je otpornost na imipenem i meropenem bila najniža u izolata koji proizvode OXA-48 (31.7 %; 61.0 %) (Tablica 9., Slika 14.).

Tablica 9. Udio izolata *K. pneumoniae* otpornih na ertapenem, imipenem i meropenem s obzirom na vrstu karbapenemaze koju izolati proizvode.

Antimikrobni lijek	Broj otpornih izolata s obzirom na vrstu karbapenemaze koju proizvode (%)				Σ
	KPC	NDM	OXA-48	NDM i OXA-48	
Ertapenem	10 (100)	53 (100)	123 (100)	14 (100)	200 (100)
Imipenem	10 (100)	38 (71.4)	39 (31.7)	11 (78.6)	98 (49.0)
Meropenem	10 (100)	41 (77.4)	75 (61.0)	12 (85.7)	138 (69.0)



Slika 14. Udio izolata *K. pneumoniae* otpornih na ertapenem, imipenem i meropenem s obzirom na vrstu karbapenemaze koju proizvode.

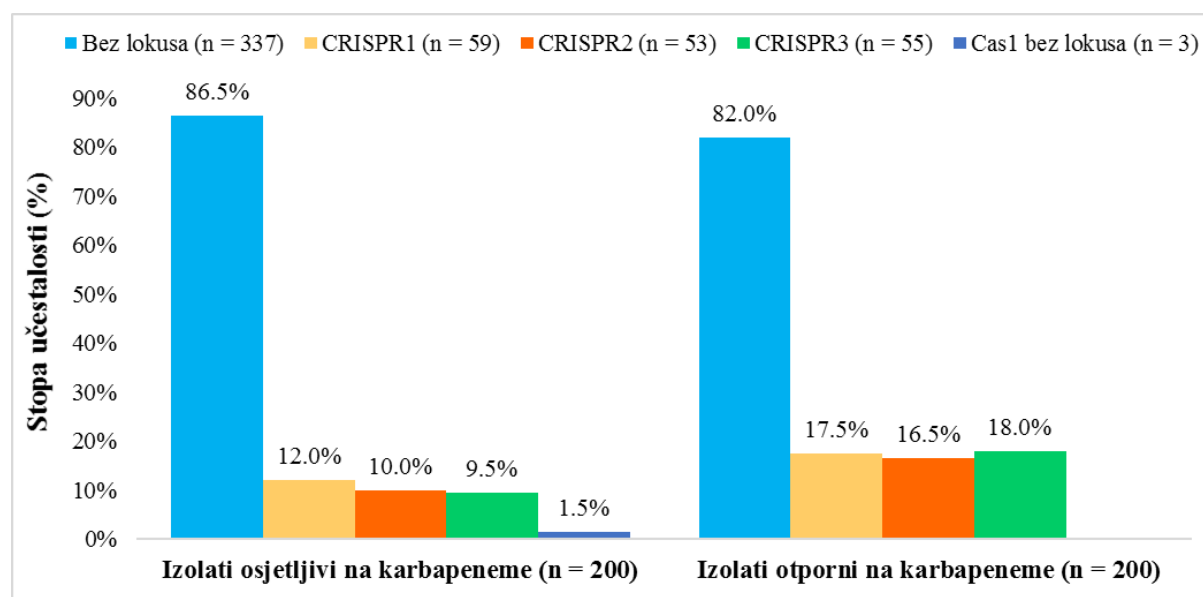
Od ukupno 97 izolata otpornih na sva tri testirana karbapenema, 10 ih je proizvodilo KPC (100 %), 38 NDM (39.2 %), 38 OXA-48 (39.2 %) i 11 NDM + OXA-48 (11.3 %). S druge strane, 61 izolat CRKp s detektiranim genom *bla* je bio osjetljiv i na imipenem i na meropenem, 41 samo na imipenem te jedan na meropenem. Od toga je najviše proizvodilo karbapenemazu OXA-48 (Tablica 10.).

Tablica 10. Udio izolata *K. pneumoniae* osjetljivih na imipenem i/ili meropenem s obzirom na vrstu karbapenemaze koju proizvode.

Tip karbapenemaze	Broj osjetljivih izolata (%)		
	Imipenem (n = 41)	Meropenem (n = 1)	Imipenem + meropenem (n = 61)
NDM (n = 15)	3 (7.3)	0 (0)	12 (19.7)
OXA-48 (n = 85)	37 (90.2)	1 (100)	47 (77.0)
NDM i OXA-48 (n = 3)	1 (2.4)	0 (0)	2 (3.3)

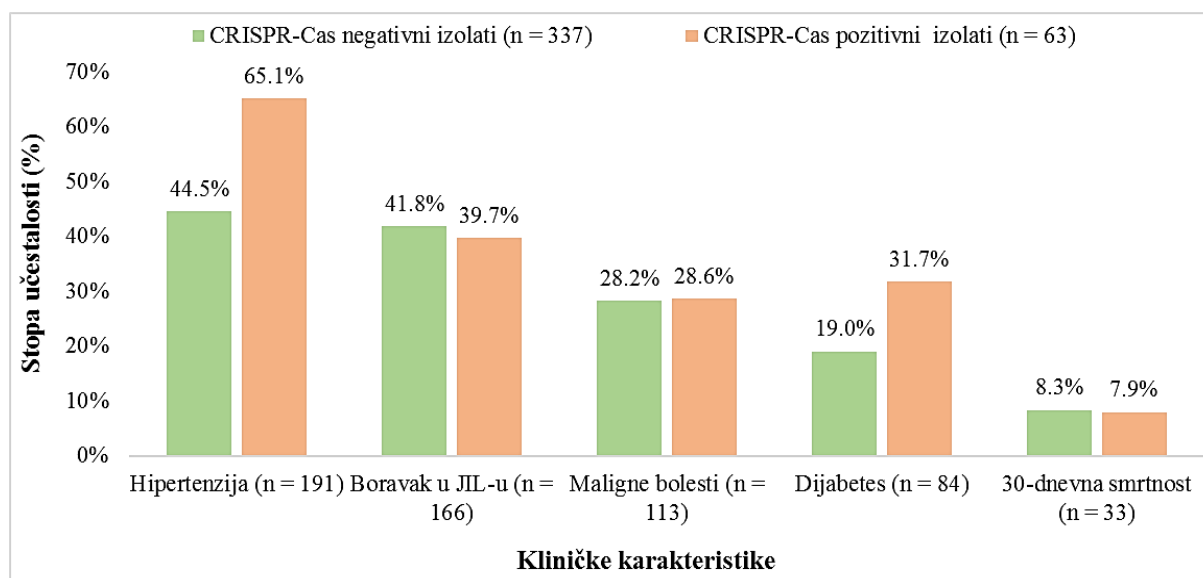
4.5. Distribucija sustava CRISPR-Cas kod izolata osjetljivih i otpornih na karbapeneme s obzirom na bolničke odjele, vrstu uzorka i kliničke karakteristike bolesnika

Gen *cas1* je pronađen kod 15.8 % (63/400), a lokusi CRISPR kod 15.0 % (60/400) izolata što ukazuje na nisku distribuciju ovog imunogenog sustava kod analiziranih kliničkih sojeva *K. pneumoniae*. Od 60 izolata koji su nosili lokuse CRISPR, kod 56 izolata (93.3 %) su pronađeni lokusi CRISPR1, CRISPR2 i/ili CRISPR3, odnosno kod ovih izolata su otkrivena oba podtipa I sustava CRISPR-Cas: I-E i I-E*. Kod tri izolata CSKp je pronađen samo lokus CRISPR1 (podtip I-E), dok je kod samo jednog izolata CRKp utvrđeno prisustvo lokusa CRISPR3 (podtip I-E*). Tri izolata CSKp, kod kojih lokusi CRISPR izostaju, su svrstana u grupu izolata pozitivnih na sustav CRISPR-Cas zbog prisutnosti gena *cas1*. Lokus CRISPR3 bio je statistički značajno češći kod izolata CRKp (OR = 2.03, 95.0 % CI [1.154, 3.790]; $p = 0.0150$), dok se učestalost lokusa CRISPR1 i CRISPR2 nije statistički značajno razlikovala između ove dvije skupine (CRISPR1: OR = 1.556, 95.0 % CI [0.888, 2.727]; $p = 0.1228$; CRISPR2: OR = 1.778, 95.0 % CI [0.982, 3.221]; $p = 0.0575$) (Slika 15.). Također nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti sustava CRISPR-Cas između izolata CS (27/200, 12.0 %) i CR (36/200, 18.0 %) ($p = 0.2173$).



Slika 15. Učestalost lokusa CRISPR 1, 2 i 3 kod izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme.

Bolesnici iz čijih uzoraka su izolirani sojevi sa sustavom CRISPR-Cas imali su veću učestalost hipertenzije, malignih bolesti i dijabetesa s obzirom na to da je veći broj izolata sa sustavom CRISPR-Cas pronađen kod izolata koji su otporni na karbapeneme. Hipertenzija (65.1 % naspram 44.5 %; $p = 0.0027$) i dijabetes (31.7 % naspram 19.0 %; $p = 0.0227$) su bili značajno češći kod bolesnika čiji su bakterijski izolati imali sustav CRISPR-Cas u usporedbi s bolesnicima u čijim izolatima sustav nije pronađen (Slika 16. i Tablica 11.).



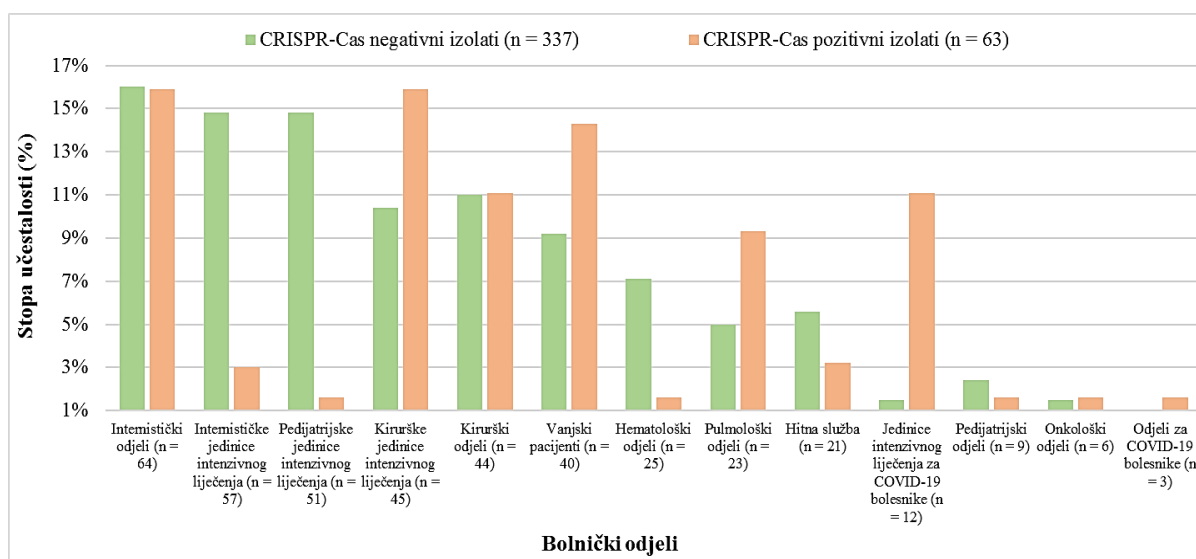
Slika 16. Učestalost CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata *K. pneumoniae* s obzirom na kliničke karakteristike bolesnika.

Izolati kod kojih je pronađen sustav CRISPR-Cas bili su značajno češći među bolesnicima hospitaliziranim na COVID-19 JIL-u (11.1 %) u usporedbi s CRISPR-Cas negativnim izolatima (1.5 %) ($p = 0.0007$). Suprotno tome, CRISPR-Cas negativni izolati bili su češći kod bolesnika hospitaliziranih na pedijatrijskom JIL-u (14.8 %) u usporedbi s 1.6 % CRISPR-Cas pozitivnih izolata ($p = 0.0016$) (Tablica 11., Slika 17.).

Tablica 11. Učestalost CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata *K. pneumoniae* s obzirom na kliničke karakteristike bolesnika i bolničke odjele s kojih izolati potječu.

Kliničke karakteristike i bolnički odjeli	Broj CRISPR-Cas negativnih izolata (%)	Broj CRISPR-Cas pozitivnih izolata (%)	p-vrijednost
Kliničke karakteristike			
Hipertenzija (n = 191)	150 (44.5)	41 (65.1)	0.0027
Boravak u JIL-u (n = 166)	141 (41.8)	25 (39.7)	0.7501
Maligne bolesti (n = 113)	95 (28.2)	18 (28.6)	0.9508
Dijabetes (n = 84)	64 (19.0)	20 (31.7)	0.0227
30-dnevna smrtnost (n = 33)	28 (8.3)	5 (7.9)	0.9216
Bolnički odjeli			
Internistički odjeli (n = 64)	54 (16.0)	10 (15.9)	0.4180
Interna JIL (n = 57)	50 (14.8)	7 (3.0)	0.4380
Pedijatrijski JIL (n = 51)	50 (14.8)	1 (1.6)	0.0016
Kirurški JIL (n = 45)	35 (10.4)	10 (15.9)	0.2064
Kirurški odjeli (n = 44)	37 (11.0)	7 (11.1)	0.9755
Vanjski bolesnici (n = 40)	31 (9.2)	9 (14.3)	0.2173
Hematološki odjeli (n = 25)	24 (7.1)	1 (1.6)	0.1511
Pulmološki odjeli (n = 23)	17 (5.0)	6 (9.3)	0.1615
Hitna služba (n = 21)	19 (5.6)	2 (3.2)	0.5512
COVID-19 JIL (n = 12)	5 (1.5)	7 (11.1)	0.0007
Pedijatrijski odjeli (n = 9)	8 (2.4)	1 (1.6)	1.0000
Onkološki odjeli (n = 6)	5 (1.5)	1 (1.6)	1.0000
COVID-19 odjeli (n = 3)	2 (0.6)	1 (1.6)	0.4028

JIL – jedinica intenzivnog liječenja



Slika 17. Učestalost CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata *K. pneumoniae* s obzirom na bolničke odjele s kojih izolati potječu.

Kada su izolati iz invazivnih i neinvazivnih uzoraka uspoređivani prema prisutnosti sustava CRISPR-Cas, nije bilo značajne razlike među različitim vrstama kliničkih uzoraka. Međutim, izolati kod kojih nije pronađen sustav CRISPR-Cas su bili značajno češći u uzorcima stolice (10.7 % naspram 1.6 %) (Tablica 12.).

Tablica 12. Usporedba CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata *K. pneumoniae* s obzirom na vrstu uzorka.

Vrsta uzorka	Broj CRISPR-Cas negativnih izolata (%)	Broj CRISPR-Cas pozitivnih izolata (%)	p-vrijednost
Invazivni uzorci (n = 79)	65 (19.3)	14 (22.2)	0.5917
Hemokultura (n = 21)	16 (4.7)	5 (7.9)	0.3503
Bris rane (n = 15)	14 (4.2)	1 (1.6)	0.4832
Aspirat traheje (n = 15)	13 (3.9)	2 (3.2)	1.0000
Bronhoalveolarni lavat (n = 14)	11 (3.3)	3 (4.8)	0.4701
Intraoperativni uzorak (n = 9)	7 (2.1)	2 (3.2)	0.6377
Ascites (n = 3)	2 (0.6)	1 (1.6)	0.4028
Punktat (n = 2)	2 (0.6)	0 (0)	1.0000
Neinvazivni uzorci (n = 315)	266 (78.9)	49 (77.8)	0.8374
Urin (n = 153)	126 (37.4)	27 (42.9)	0.4129
Bris rektuma (n = 71)	57 (16.9)	14 (22.2)	0.3121
Stolica (n = 37)	36 (10.7)	1 (1.6)	0.0172
Bris ždrijela (n = 25)	22 (6.5)	3 (4.8)	0.7801
Iskašljaj (n = 13)	11 (3.3)	2 (3.2)	1.0000
Bris nazofarinksa (n = 6)	4 (1.2)	2 (3.2)	0.2406
Bris prepone (n = 5)	5 (1.5)	0 (0)	1.0000
Perianalni bris (n = 3)	3 (0.9)	0 (0)	1.0000
Bris pazuha (n = 2)	2 (0.6)	0 (0)	1.0000
Ostali uzorci (n = 6)	6 (1.8)	0 (0)	0.5957

4.6. Korelacija između prisutnosti sustava CRISPR-Cas i antimikrobne otpornosti

U izolatima bez sustava CRISPR-Cas statistički je značajno češće bio prisutan gen *bla_{OXA-48}* (35.6 %), dok su u izolatima sa sustavom CRISPR-Cas, točnije s podtipovima I-E i/ili I-E*, statistički značajno češće bili prisutni geni *bla_{NDM-1}* (44.6 %) i *bla_{KPC-2}* (10.7 %). Istovremeno prisustvo gena koji kodiraju za karbapenemaze *bla_{OXA-48}* i *bla_{NDM-1}* bilo je češće u CRISPR-Cas negativnim izolatima, ali ta razlika nije bila statistički značajna (p = 0.9290).

Odsutnost gena *bla* bila je statistički značajno češća kod sojeva u kojima nije pronađen sustav CRISPR-Cas (51.3 %) (Tablica 13.).

Tablica 13. Usporedba pojave gena *bla* koji kodiraju za karbapenemaze i prisutnosti sustava CRISPR-Cas u izolatima *K. pneumoniae* (n = 400).

Gen koji kodira za karbapenemazu	Sustav CRISPR-Cas					p-vrijednost
	<i>cas1</i> bez lokusa (n = 3)	Podtip I-E (n = 3)	Podtip I-E* (n = 1)	Podtipovi I-E i I-E* (n = 56)	Odsutan (n = 337)	
<i>bla</i> _{NDM-1} (n = 53)	0	0	0	25 (44.6 %)	28 (8.3 %)	< 0.0001
<i>bla</i> _{KPC-2} (n = 10)	0	0	1 (100 %)	6 (10.7 %)	3 (0.9 %)	< 0.0001
<i>bla</i> _{OXA-48} (n = 123)	0	0	0	3 (5.3 %)	120 (35.6 %)	< 0.0001
<i>bla</i> _{OXA-48} i <i>bla</i> _{NDM-1} (n = 14)	0	0	0	1 (1.8 %)	13 (3.9 %)	0.9290
Odsutan (n = 200)	3 (100 %)	3 (100 %)	0	21 (37.5 %)	173 (51.3 %)	0.0296

Kada se uspoređivala antimikrobna otpornost, veći postotci otpornosti zabilježeni su za CRISPR-Cas pozitivne izolate, premda razlike u odnosu na CRISPR-Cas negativne izolate nisu bile statistički značajne za većinu antimikrobnih lijekova. Tako su izolati sa sustavom CRISPR-Cas pokazali otpornost na kolistin u 55.6 % slučajeva kod sojeva CRKp u usporedbi s 14.6 % kod sojeva CSKp; na kombinaciju ceftazidim + avibaktan u 50.0 % slučajeva u usporedbi s 20.0 % slučajeva; na imipenem u 47.4 % u usporedbi s 22.5 %; na trimetoprim + sulfametoksazol u 59.2 % u usporedbi s 44.1 % te na meropenem u 49.1 % u usporedbi s 34.8 % slučajeva. Statistički značajna razlika je zabilježena jedino za kombinaciju imipenem + relebaktam, pri čemu su CRISPR-Cas negativni izolati pokazali statistički značajno veću otpornost (73.3 %, 11/15) u odnosu na CRISPR-Cas pozitivne izolate (42.9 %, 3/7) (Tablica 14.). Samo je jedan soj CRKp, izoliran iz punktata, bio otporan na svih 18 testiranih antimikrobnih lijekova s vrijednostima MIK 128 µg/ml za imipenem i meropenem te 32 µg/ml za kolistin. Stoga se za ovaj soj može reći da je spada u sojeve PDR, odnosno da je neosjetljiv na sve lijekove u svim testiranim antimikrobnim klasama. Ovaj izolat također proizvodi dvije vrste karbapenemaza, odnosno nosi gene *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} te kod njega nije detektiran sustav CRISPR-Cas.

Tablica 14. Usporedba stope antimikrobne otpornosti CRISPR-Cas negativnih i pozitivnih izolata *K. pneumoniae* (n = 400).

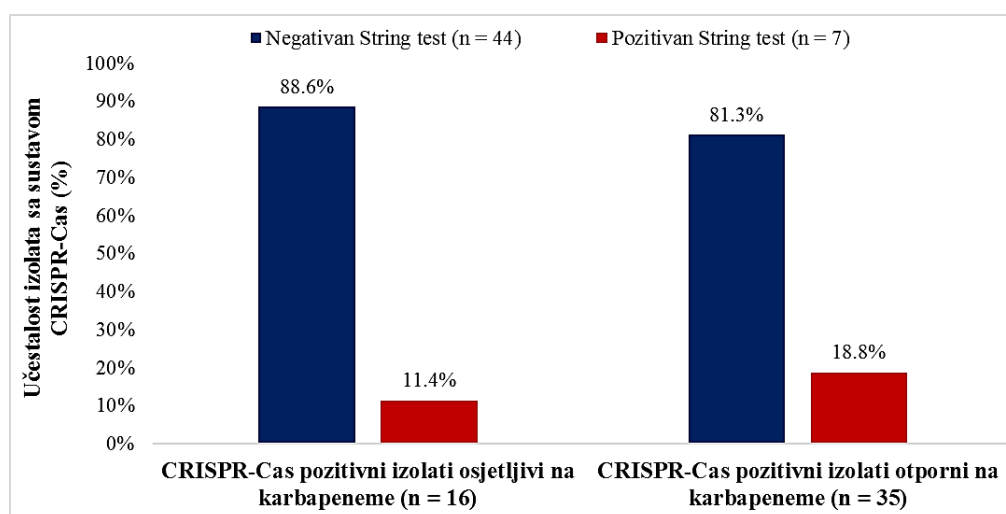
Antimikrobni lijek (n)	Broj CRISPR-Cas negativnih izolata (%)		Broj CRISPR-Cas pozitivnih izolata (%)		p-vrijednost
	Ukupan broj testiranih izolata	Stopa otpornosti (%)	Ukupan broj testiranih izolata	Stopa otpornosti (%)	
Ampicilin/amoksisilin (n = 400)	337	100.0	63	100.0	N/A
Amoksisilin + klavulanska kiselina (n = 400)	337	49.0	63	57.1	N/A
Cefaleksin (n = 143)	122	49.2	21	42.9	0.6632
Cefuroksim (n = 399)	336	48.2	63	57.1	1.0000
Ciprofloksacin (n = 400)	337	48.7	63	60.3	N/A
Levofloksacin (n = 397)	335	46.3	62	59.7	0.4028
Cefpodoksime (n = 148)	127	50.4	21	42.9	0.5119
Cefiksime (n = 146)	125	48.8	21	42.9	0.5700
Gentamicin (n = 400)	337	29.7	63	42.9	N/A
Amikacin (n = 376)	318	14.5	58	13.8	0.5603
Trimetoprim + sulfametoksazol (n = 312)	263	44.1	49	59.2	0.9630
Ceftazidime (n = 373)	315	49.8	58	60.3	0.5945
Cefotaksim (n = 373)	315	50.5	58	62.1	0.5945
Ceftriakson (n = 372)	314	50.3	58	60.3	0.7873
Cefepime (n = 374)	316	50.3	58	60.3	0.5810
Piperacilin + tazobaktam (n = 373)	315	51.4	58	63.8	0.5945
Ertapenem (n = 400)	337	48.7	63	57.1	N/A
Imipenem* (n = 373)	316	22.5	57	47.4	0.3396
Meropenem* (n = 373)	316	34.8	57	49.1	0.3396
Kolistin* (n = 200)	164	14.6	36	55.6	0.2173
Ceftazidime + avibaktam (n = 185)	155	20.0	30	50.0	0.8125
Ceftolozan + tazobaktam (n = 109)	96	90.6	13	92.3	0.1994
Imipenem + relebaktam (n = 22)	15	73.3	7	42.9	0.0335
Cefiderokol (n = 17)	16	12.5	1	0.0	0.4920

* – antibiotik za koji je profil osjetljivosti za 200 sojeva CRKp određen vrijednostima MIK dobivenima mikrodilucijom u bujonu

N/A (eng. *Not Applicable*) – p-vrijednost nije primjenjiva kada su svi izolati (n = 400) testirani na sva antimikrobna sredstva (n = 400)

4.7. Rezultati *string* testa

String test je proveden na ukupno 16 CSKp i 35 CRKp CRISPR-Cas pozitivnih izolata uspješno poraslih na selektivnom hranjivom agaru MacConkey kako bi se utvrdilo javlja li se HMV kod ispitivanih kliničkih izolata, i ako se javlja, je li u korelaciji s pojavom fenotipa otpornosti na karbapeneme i/ili prisutnošću sustava CRISPR-Cas. Za ukupno 13.7 % (7/51) izolata je otkriven virulentni HMV fenotip u obliku viskozne vrpce veće od 5 mm, a od toga su 4 soja bila CRKp (13, 23, 32, 36), a 3 CSKp (43, 49, 57) (Slika 18.). Izolati CRKp (4/35; 11.4 %) i CSKp (18.8 %; 3/16) se nisu statistički značajno razlikovali ($p = 0.2076$).

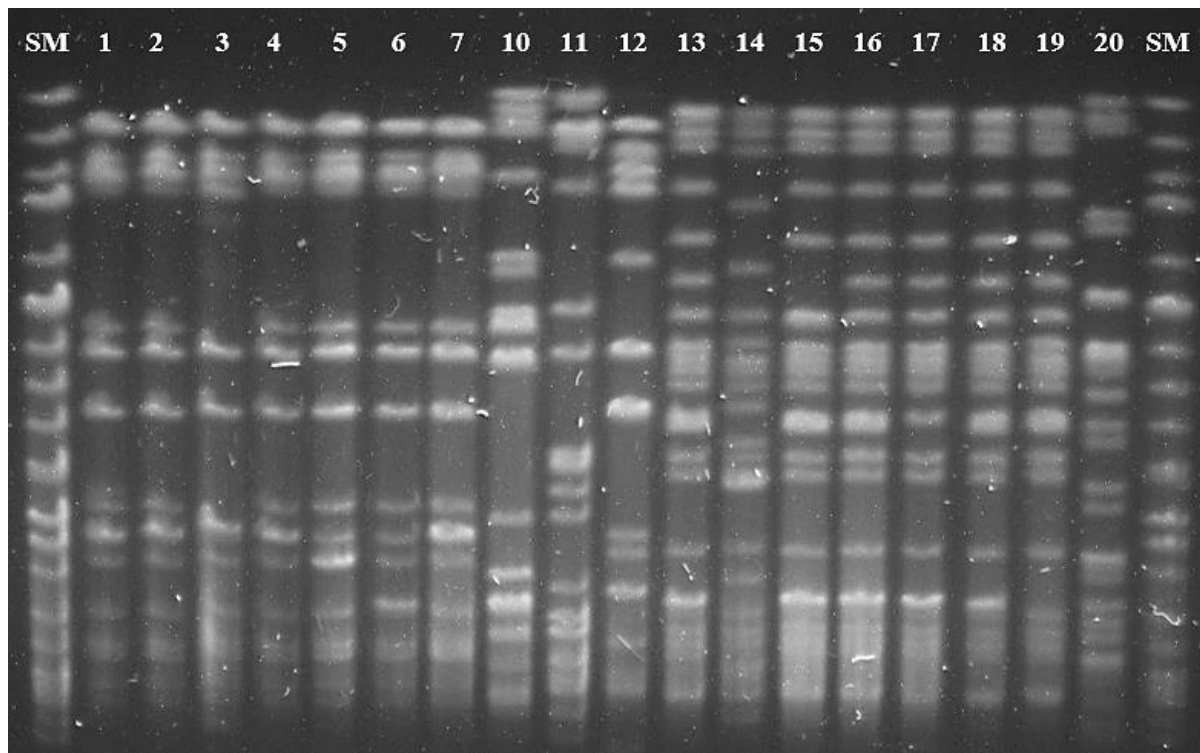


Slika 18. Rezultati *String* testa izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme kod kojih je detektiran sustav CRISPR-Cas (n = 51).

4.8. Molekularna epidemiologija

Kako bi se utvrdila genetička srodnost sojeva, nakon razgradnje ukupne bakterijske DNA restrikcijskim enzimom XbaI, gel elektroforeza u izmjeničnom električnom polju (PFGE) je provedena na ukupno 50 CRISPR-Cas pozitivnih izolata *K. pneumoniae* (15 CSKp i 35 CRKp) koji su uspješno porasli na selektivnom hranjivom agaru MacConkey. Po završetku PFGE-a, provedena je vizualna analiza makrorestrikcijskih profila kromosomske DNA s ciljem tipizacije bakterija, točnije određivanja pulsotipova. Izolati su na osnovu različitih pulsotipova svrstani u 20 različitih PFGE grupa (0001-0020) od kojih se svaka grupa razlikuje od ostalih za više od šest DNA fragmenata u restrikcijskom profilu te se takve grupe smatraju nesrodnima (Tenover i sur., 1995; Jelić 2018.). Iako je opisano 20 različitih PFGE grupa, utvrđena su samo tri klonalna klastera jer prema definiciji klaster čine barem tri izolata sa sličnošću ≥ 85.0 %. Stoga su ukupno 33 od 50 izolata (66.0 %) klasificirana u tri dominantna PFGE klastera:

klaster I obuhvaća 22 izolata CRKp (13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 35, 36, 37, 40, 70, 71) – 44.0 % (22/50); klaster II tri izolata CSKp (51, 58, 59) – 6.0% (3/50), a klaster III osam izolata CRKp (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12) – 16.0 % (Slika 19.).



Slika 19. Makrorestrikcijski profili 18 CRISPR-Cas pozitivnih CRKp izolata (1-7; 10-20) dobivenih gel elektroforezom u izmjeničnom električnom polju. SM – standard molekulskih masa „CHEF DNA Size Standard“.

Osim metode PFGE, za detaljnije određivanje klonskog tipa izolata korištena je i metoda tipizacije sljedova više lokusa (MLST) na jednom predstavniku svakog pulsotipa, pod pretpostavkom da svi izolati iste PFGE grupe dijele isti klonski tip. Izolati su birani nasumično, a analiza MLST je provedena na 39 od ukupno 63 CRISPR-Cas pozitivnih izolata. Od toga je bilo 26 reprezentativnih PFGE izolata s prethodno određenim pulsotipom te 13 izolata (8, 41, 42, 43, 45, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 69) koji nisu porasli na agaru MacConkey te zato za iste nije bilo moguće provesti PFGE analizu, zbog čega tih 13 izolata nije prikazano na slici 20. Metodom MLST određene su sekvence sedam domaćinskih gena (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) za 63 izolata bakterije *K. pneumoniae* sa sustavom CRISPR-Cas. Na osnovu različitih kombinacija gena (alela) sojevi su svrstani u pripadne grupe ST. Utvrđeno je 19 različitih klonskih tipova s različitim kombinacijama alela, od kojih su najzastupljenije grupe ST bile ST15 (38.0 %), ST35 (15.9 %), ST101 (12.7 %), ST23 (4.8 %) i ST14 (3.71 %). U

preostalih 14 grupa ST je svrstan po jedan izolat. Dva izolata CSKp (47 i 49) se nisu mogla tipizirati metodom MLST te su označeni kao netipabilni (NT) (Tablica 15.).

Tablica 15. Grupe ST CRISPR-Cas pozitivnih izolata *K. pneumoniae* (n = 63) i pripadajuće kombinacije alela.

Grupa ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	CRISPR-Cas pozitivni izolati (CSP)	Ukupan broj izolata (%)
15**	1	1	1	1	1	1	1	13 (CR)*, 14 (CR), 15 (CR)*, 16 (CR), 17 (CR), 18 (CR), 19 (CR), 21 (CR), 22 (CR), 23 (CR), 24 (CR), 25 (CR), 26 (CR), 27 (CR), 28 (CR)*, 29 (CR), 31 (CR), 35 (CR), 36 (CR), 37 (CR), 40 (CR)*, 70 (CR)*, 71 (CR)*, 46 (CS)*	24 (38.0)
35**	2	1	2	1	10	1	19	42 (CS)*, 51 (CS)*, 55 (CS), 57 (CS), 58 (CS), 59 (CS), 62 (CS), 65 (CS)*, 68 (CS)*, 69 (CS)*	10 (15.9)
101	2	6	1	5	4	1	6	1 (CR), 2 (CR), 3 (CR), 4 (CR), 5 (CR), 6 (CR), 7 (CR), 12 (CR)*	8 (12.7)
23	2	1	1	1	9	4	12	41 (CS)*, 43 (CS), 54 (CS)*	3 (4.8)
14	1	6	1	1	1	1	1	8 (CR)*, 10 (CR)*	2(3.17)
13	2	3	1	1	10	1	19	44 (CS)	1 (1.6)
111	2	1	5	1	17	4	42	53 (CS)*	1 (1.6)
147	3	4	6	1	7	4	38	20 (CR)	1 (1.6)
151	4	1	32	1	7	4	10	48 (CS)*	1 (1.6)
392	3	4	6	1	7	4	40	39 (CR)	1 (1.6)
437	3	3	1	1	1	1	31	11 (CR)	1 (1.6)
866	2	9	2	1	1	1	4	50 (CS)	1 (1.6)
879	2	1	1	1	145	1	9	52 (CS)*	1 (1.6)
1391	2	1	1	26	10	1	14	45 (CS)	1 (1.6)
1414	2	1	20	1	10	96	38	60 (CS)	1 (1.6)
381	10	6	1	9	12	42	9	61 (CS)	1 (1.6)
306	2	1	1	1	66	1	6	63 (CS)*	1 (1.6)
2515	2	1	2	1	1	1	19	56 (CS)*	1 (1.6)
3661	2	6	5	1	1	4	223	64 (CS)	1 (1.6)
NT	/	/	/	/	/	/	/	47 (CS)	1 (1.6)
NT	/	/	/	/	/	/	/	49 (CS)*	1 (1.6)

** – izolati grupe ST za koje je pronađeno više od jednog pulsotipa PFGE

NT (eng. *Non-Typable*) – nije tipabilan

CSP (eng. *Carbapenem Susceptibility Profile*) – profil osjetljivosti na karbapeneme

CR (eng. *Carbapenem-Resistant*) – izolati otporni na karbapeneme

CS (eng. *Carbapenem-Susceptible*) – izolati osjetljivi na karbapeneme

* – 23 izolata čiji su lokusi CRISPR sekvencirani

Ista PFGE grupa se uglavnom podudarala s jednom ST grupom. Izuzetak je izolat CRKp 14 koji proizvodi karbapenemaze NDM-1 i OXA-48 te je klasificiran kao pulsotip 0013, dok

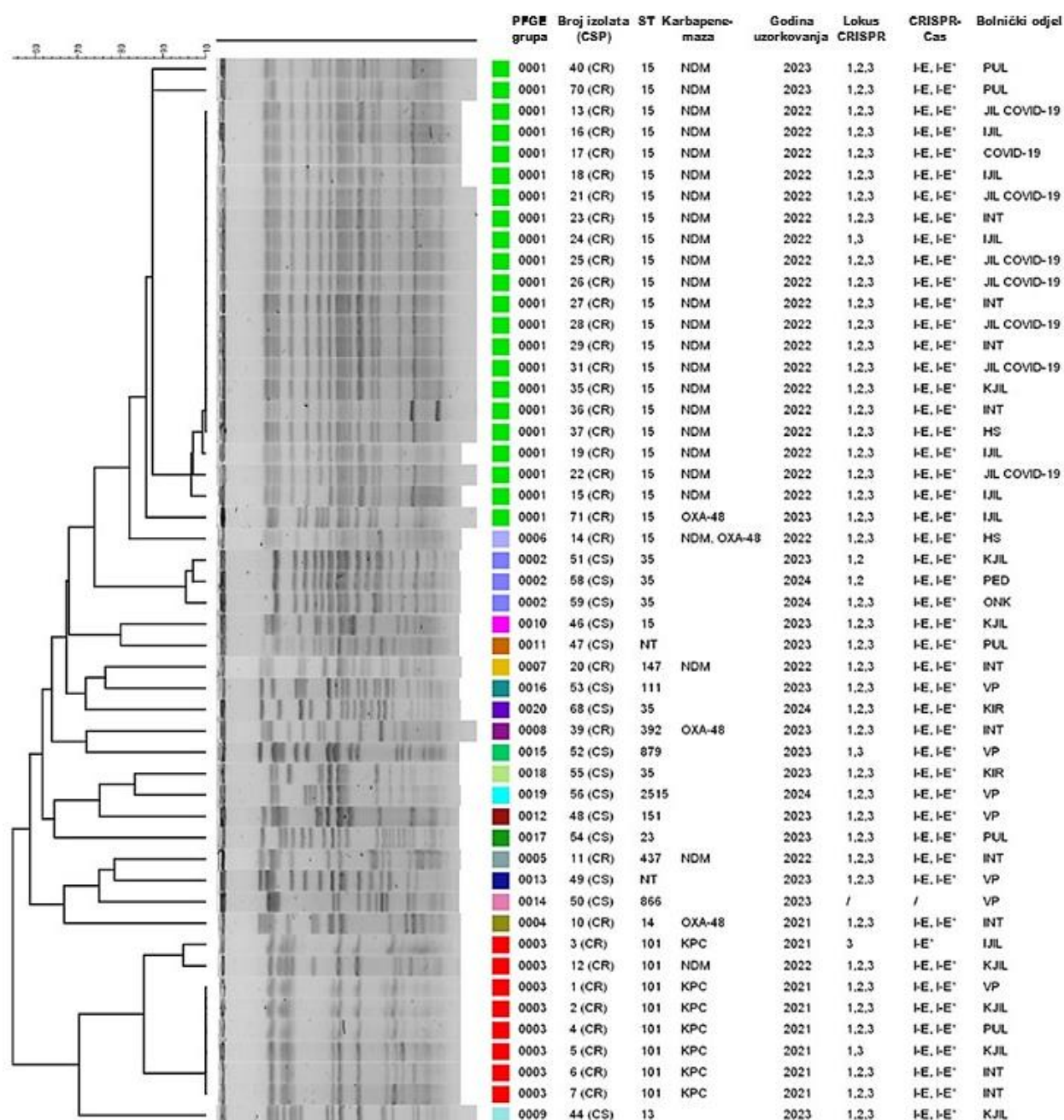
svi ostali izolati CRKp iz grupe ST15 proizvode karbapenemazu NDM-1 i klasificirani su kao pulsotipovi 0012. Slično je opaženo i kod pet izolata iz grupe ST35 (51, 55, 58, 59, 68) koja se povezuje s tri različita makrorestriksijska pulsotipa (0002, 0018, 0020). Neočekivano je i da izolati CRKp 11 (ST347), 20 (ST147) i 39 (ST392) proizvode karbapenemaze, a imali su makrorestriksijske i ST profile najbližije osjetljivim sojevima CSKp 49 (NT), 53 (ST111) i 52 (ST879). Zanimljivo je i da sva tri CRKp izolata (11, 20, 39) potječu s internističkih odjela, dok su sva tri CSKp soja (49, 53, 52) izolirana iz vanjskih pacijenata (Slika 20.). Tablica 16. prikazuje dominantne grupe ST za svaku od 14 različitih skupina odjela.

Tablica 16. Prikaz odjela s kojih su 63 CRISPR-Cas pozitivna izolata *K. pneumoniae* potekla s obzirom na prevladavajuću grupu ST.

Bolnički odjeli	Broj CRISPR-Cas pozitivnih uzoraka (%)	Dominantna grupa ST
Internistički odjeli	10 (15.87)	ST15
Kirurške jedinice intenzivnog liječenja	10 (15.87)	ST101
Vanjski pacijenti	9 (14.29)	ST35
Internističke jedinice intenzivnog liječenja	7 (11.11)	ST15
Jedinice intenzivnog liječenja za COVID-19 bolesnike	7 (11.11)	ST15
Kirurški odjeli	7 (11.11)	ST35
Pulmološki odjeli	6 (9.52)	ST15
Hitna služba	2 (3.17)	ST15
Hematološki odjeli	1 (1.59)	ST35
Odjeli za COVID-19 bolesnike	1 (1.59)	ST15
Onkološki odjeli	1 (1.59)	ST35
Pedijatrijske jedinice intenzivnog liječenja	1 (1.59)	ST3661
Pedijatrijski odjeli	1 (1.59)	ST35

Nakon što se odredila pripadnosti grupama ST, izolati su analizirani i prema otpornosti na karbapeneme i posjedovanju sustava CRISPR-Cas. Tako je kod 27 izolata CSKp, koji su imali sustav CRISPR-Cas, identificirano ukupno 14 različitih grupa ST, pri čemu su izolati grupe ST35 (10/27, 37.0 %) i ST23 (3/27, 11.1 %) bili najzastupljeniji, a ostalih 14 sojeva CSKp su svrstani svaki u svoju grupu ST: ST35, ST23, ST15, ST13, ST111, ST151, ST866, ST879, ST1391, ST1414, ST381, ST306, ST2515 i ST3661. Kod 36 izolata CRKp sa sustavom CRISPR-Cas otkriveno je šest grupa ST, od kojih je najčešća bila grupa ST15 (23/36, 63.9 %), zatim ST101 (8/36, 22.2 %) i ST14 (2/36, 5.6 %). U preostale tri grupe ST je svrstan po jedan

izolat CRKp: ST147 (2.8 %), ST392 (2.8 %) i ST437 (2.8 %) (Tablica 15.). Analize PFGE i MLST otkrile su genetske srodnosti i raznolikosti izolata sa sustavom CRISPR-Cas te na taj način utvrdile klonsku povezanost istih. Primijećeno je da izolati CRKp koji proizvode karbapenemaze pokazuju smanjenu genomsku raznolikost, grupirajući se u dva PFGE klastera, odnosno dvije grupe ST - ST15 je povezana s prisutnošću gena *bla_{NDM}* (n = 22), a ST101 s prisutnošću genima *bla_{KPC}* (n = 7). Značajno je da su sojevi iz grupe ST15 CRKp uglavnom izolirani kod bolesnika hospitaliziranih na COVID-19 odjelu i COVID-19 JIL-u tijekom 2022. godine (8/23, 34.8 %), dok su sojevi CRKp sojevi iz grupe ST101 bili dominantni 2021. godine na različitim odjelima. Među izolatima CSKp, ST35 skupina bila je najzastupljenija na kirurškim odjelima (KIR) (Slika 20.). Od ukupno 63 izolata pozitivna na sustav CRISPR-Cas, 23 soja su odabrana za detaljnu analizu lokusa CRISPR.



Slika 20. Prikaz 50 CRISPR-Cas pozitivnih izolata *K. pneumoniae* prema klasterima PFGE definiranim s obzirom na minimalnu sličnost uzoraka od 85.0 % s najmanje tri takva izolata, identifikacijskom broju izolata, profilu osjetljivosti na karbapeneme (eng. *Carbapenem Susceptibility Profile*, CSP), sekvencijskom tipu (ST-u), tipu karbapenemaze, godini uzorkovanja, tipovima lokusa CRISPR (1, 2 i/ili 3), podtipu sustava CRISPR-Cas (I-E i/ili I-E*) te bolničkom odjelu. CR – izolati otporni na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Resistant*), CS – izolati osjetljivi na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Susceptible*); PUL – pulmološki odjeli, JIL COVID-19 – jedinice intenzivnog liječenja za COVID-19 bolesnike, IJIL – internističke jedinice intenzivnog liječenja, COVID-19 – odjeli za COVID-19 bolesnike, INT – internistički odjeli, KJIL – kirurške jedinice intenzivnog liječenja, HS – hitna služba, PED – pedijatrijski odjeli, ONK – onkološki odjeli, KIR – kirurški odjeli, VP – vanjski pacijenti.

4.9. Polimorfizmi lokusa CRISPR i korelacija s otpornošću na karbapeneme, grupom ST i bolničkim odjelima

23 CRISPR-Cas pozitivna izolata *K. pneumoniae* su odabrana za detaljnu analizu lokusa CRISPR1, 2 i 3. Ukupno je sekvencirano 40 lokusa CRISPR – 13 lokusa CRISPR1, 12 lokusa CRISPR2 i 15 lokusa CRISPR3. Sva tri lokusa su sekvencirana kod šest izolata te su ti izolati poslužili kao reprezentativni. Od toga su tri izolata pripadala skupini CSKp – 46 (ST15), 63 (ST306), 65 (ST35), a tri skupini CRKp – 8 (ST14), 28 (ST15), 71 (ST15). Zanimljivo je da izolat CSKp 46, iako je osjetljiv na karbapeneme i ne proizvodi karbapenemaze, pripada grupi ST15 koja je specifična za izolate otporne na karbapeneme. Preciznije, izolat CSKp 46 ima iste razmaknice kao izolati CRKp grupe ST15 koji većinom potječu s COVID-19 odjela i JIL-a. Dakle izolat CSKp 46 ima sve karakteristike CRKp izolata, osim što ne nosi niti jedan karbapenemazni gen *bla*. Soj potječe s kirurškog JIL-a što ukazuje na to da su sojevi grupe ST15 tijekom 2022. godine bili rasprostranjeni na gotovo svim odjelima Kliničkog bolničkog centra Zagreb te je većina tih sojeva nosila iste razmaknice u svojim lokusima CRISPR.

Svaki lokus CRISPR1-3 imao je od 3 do 10 razmaknica raznolikog slijeda nukleotida. Najveći broj razmaknica imao je lokus CRISPR1 izolata CSKp 52 (ST879) s 10 razmaknica, dok je lokus CRISPR2 izolata CSKp 41 (ST151) sadržavao samo 3 razmaknice. Iste razmaknice iz lokusa CRISPR1 često su bile pronađene u različitim izolatima s različitih odjela. Tako je lokus CRISPR1 izolata CRKp 8 (ST14) i CSKp 49 (NT) bio identičan lokusima CRISPR1 izolata grupe ST15 (28, 40, 71, 46). Navedeni izolati sa sojem CSKp 54 (ST23) dijele 6 razmaknica, odnosno sa sojem 53 (ST111) dijele dvije razmaknice, što ukazuje na dinamičnu rasprostranjenost razmaknica ovog lokusa (Slika 21.).

a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata 8, 28, 40, 46, 49, 71 TGCCTCCAATGAATCACCGCCTGCTAACCGG CGTGTGGAAGCGACCTCGTAGCCGAGCCAGTC CGTCATCAGCGCCTTGTTCAGCGCGACCACC TCCAGTCGTGCTAGTCTCGGTAATGTCCTCGA TATCGTGCAGAGTCACAACCTGACGGGATTATC TCGTGCATGGTGAGGATTCTACAGTCGCACCAT TACCTCCCGGCGTCCGCGCCAGGGCGATCACGT CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG TTCATCACGTGTGAGCGGATTGGCTCTATCCT	b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 54 CGGCTCTTTTTATCTCCTTCATCCTTCGCTAT TGATCGGCGTGCCGTTTGTGGACCCGAAATAG CGTCATCAGCGCCTTGTTCAGCGCGACCACC TATCGTGCAGAGTCACAACCTGACGGGATTATC TCGTGCATGGTGAGGATTCTACAGTCGCACCAT TACCTCCCGGCGTCCGCGCCAGGGCGATCACGT CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG TTCATCACGTGTGAGCGGATTGGCTCTATCCT	c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 53 CGATTACCTCTCCACCCGCTTGGCGGGAAAA TGGTCATCGCGCCCTTGGCCTGCTCTGCGCTG TGCGCGATATCCGCGCCGCTTAGCGATGTGGT TGTCTGGGACAGCAAAGGACGCCGTAACGAGG TCCTTCATTAAAGTGAGCAATTGCTCTCTTTTT CCTGCAGCTGGTCTGCGAGCTGACGGATGCCGG TTCATCACGTGTGAGCGGATTGGCTCTATCCT
--	---	---

Slika 21. Prikaz razmaknica sekvenciranih lokusa CRISPR1 sojeva *K. pneumoniae* otpornih i osjetljivih na karbapeneme. a) Lokus CRISPR1 sojeva CRKp i CSKp (8, 28, 40, 46, 49, i 71) s istim setom razmaknica. b) i c) Prikaz lokusa CRISPR1 sojeva CSKp 54 i 53 koji dijele šest, odnosno dvije razmaknice sa sojevima 8, 28, 40, 46, 49 i 71. Crvena boja – razmaknice specifične za sve sojeve 8, 28, 40, 46, 49, 71; plava boja – zajedničke razmaknica lokusa CRISPR1 sojeva 8, 28, 40, 46, 49, 71 i 54; narančasta boja – zajedničke razmaknice lokusa CRISPR1 svih izolata CRKp (8, 28, 40 i 71) i četiri izolata CSKp (46, 49, 53 i 54); crna boja – "nove" razmaknice izolata CSKp 53 koje nisu pronađene drugdje u sekvenciranim lokusima CRISPR1.

Lokus CRISPR2 je bio visoko konzerviran što znači da je sadržavao sličan set razmaknica primijećen kod većine sojeva CSKp – 56 (ST2515), 65 (ST35), 63 (ST305), 69 (ST35) te potpuno drugačiji set razmaknica kod svih sojeva CRKp – 8 (ST14), 12 (ST15), 15 (ST15), 71 (ST15) (Slika 22.). Izuzetak je lokus CRISPR2 soja 41 (ST23) koji, iako spada u skupinu izolata CSKp, prvih šest razmaknica dijeli s lokusom CRISPR2 svih sekvenciranih izolata CRKp, dok su zadnje dvije razmaknice lokusa "nove", odnosno nisu pronađene u drugim sekvenciranim lokusima CRISPR sojeva iz ovog istraživanja, ali su homologne s drugim sekvencama iz baze podataka GenBank. Slično je uočeno i kod lokusa CRISPR2 izolata 48 (ST151) koji dijeli samo prvu razmaknicu sa sojem 41 te sojevima CRKp 8, 12, 15 i 71, dok su zadnje dvije razmaknice također "nove". Stoga se može reći da je proksimalna razmaknica 5'-AGGATAGAGCCAAATCCGCTCACACGTGATGA-3', za koju se smatra da je zadnja ugrađena, zajednička lokusima CRISPR2 izolata CRKp 8, 12, 15 i 71 te CSKp 41 i 48 (Slika 22.). Iako su lokusi kod izolata CRKp konzervirani, pojavnost prve proksimalne razmaknice i kod osjetljivih izolata, može ukazivati na nedavnu aktivnost. Suprotno tomu, lokusi CRISPR1 i CRISPR2 izolata 63 (ST306) i 65 (ST35) su identični što sugerira da lokusi možda nisu aktivni ili da su sojevi bili izloženi istom stranom genetskom materijalu s obzirom na to da oba soja potječu s kirurških odjela.

a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CRKp 8, 12, 15 i 71 AGGATAGAGCCAAATCCGCTCACACGTGATGA CCGGCATCCGTCAGCTCGACGGCCAGCTGCAG ACGTGATCGCCCTGGCGCGGACGCCGGGAGGT ATGGTGCAGCTGTAGAATCCTCACCATGCACG GATAATCCCGTCAGGTTGTGACTCTGCACGAT TGAGGACATTACCGAGGACTACGACGACTGG GGTGGTCGCCGCTGGAACAAGCGCTGATGAC GACTGGCTCGGCTACGAGGTGCGCTTCGACAC CCGGTTAGCAGGCCGGTGATTGCATTGGAGGC	b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 41 AGGATAGAGCCAAATCCGCTCACACGTGATGA CCGGCATCCGTCAGCTCGACGGCCAGCTGCAG ACGTGATCGCCCTGGCGCGGACGCCGGGAGGT ATGGTGCAGCTGTAGAATCCTCACCATGCACG GATAATCCCGTCAGGTTGTGACTCTGCACGAT GGTGGTCGCCGCTGGAACAAGCGCTGATGAC CTATTTCGGGTCCAACAAACGGCACGCCGATC ATAGCGAAGGATGAAGGAGATAAAAAAGAGCC c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 48 AGGATAGAGCCAAATCCGCTCACACGTGATGA TCTTAATCTTTTATTAAATAGCGTTGGTGAAG TTTGCCAAAATGCGCTCACCGTCGCGAATTT	d) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 69 CCTTTGCCGATTGTCCAGGCGCCACAGCCAATG TAAATGCTAAAAGCCGTCGATGACGTTGAAAA GCGGAGATCGAGCCATCGGAGCGAATGAAACAG CGAGCGTGTGGCTGAAATCCCGTTAAATATCG e) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 56, 63 i 65 CCTTTGCCGATTGTCCAGGCGCCACAGCCAATG TAAATGCTAAAAGCCGTCGATGACGTTGAAAA GCGGAGATCGAGCCATCGGAGCGAATGAAACAG CACGCCAAAGATATACCGTTTGAGGTGTCTTG AAATTGATGAGTGAATCAATCGTCATACTATA TCGCCCGCGCTCCAGGGAGGCGATGAGCTCG CGAGCGTGTGGCTGAAATCCCGTTAAATATCG
--	---	---

Slika 22. Prikaz razmaknica sekvenciranih lokusa CRISPR2 sojeva *K. pneumoniae* otpornih i osjetljivih na karbapeneme. a) Prikaz lokus CRISPR2 sojeva CRKp 8, 12, 15 i 71 s konzerviranim setom razmaknica. b) i c) Lokusi CRISPR2 sojevi CSKp 41 i 48 imaju zajedničku proksimalnu razmaknicu sa sojevima CRKp 8, 12, 15 i 71, dok soj 41 dijeli još pet razmaknica sa sojevima CRKp 8, 12, 15 i 71. d) i e) Konzerviran set razmaknica lokusa CRISPR2 sojeva CSKp 69, 56, 63 i 65. Plava boja – zajednička proksimalna razmaknica sojeva 8, 12, 15 i 71, 41 i 48; zlatna boja – razmaknice koje dijele svi izolati CRKp (8, 12, 15 i 71) i soj CSKp 41; crvena boja – razmaknice specifične samo za sojeve CRKp 8, 12, 15 i 71; crna boja – "nove" razmaknice sojeva CSKp 41 i 48 koje nisu pronađene drugdje u sekvenciranim lokusima CRISPR2; ljubičasta boja – razmaknice specifične za sojeva CSKp 69, 56, 63 i 65; zelena boja – razmaknice pronađene samo kod sojeva CSKp 56, 63 i 65.

Prvu proksimalnu razmaknicu lokusa CRISPR3 (5'-TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA-3') dijele brojni izolati CSKp (41, 42, 46, 63, 68) i CRKp (8, 10, 12, 13, 28, 70, 71) svrstani u grupe ST23, ST35 i ST306, odnosno grupe ST14, ST15 i ST101. Osim prve razmaknice, većina navedenih sojeva (8, 10, 12, 13, 28, 46, 63, 70 i 71) dijeli i drugu razmaknicu lokusa CRISPR3 (5'-AGAACGAATGCCCCGCGCTGGTACGGCGCGTCGTGGATTCC-3') (Slika 23.). Oba izolata CSKp grupe ST23 (41, 54) imaju varijabilne lokuse CRISPR – dijele barem jednu razmaknicu lokusa CRISPR1, CRISPR2 i CRISPR3 s barem još jednim sekvenciranom lokusima drugih izolata, dok su preostale razmaknice "nove". Lokus CRISPR1 izolata 54 je prikazan na slici 21., dok su lokusi CRISPR2 i CRISPR3 izolata 41 prikazani na slikama 22. i 23. Dijeljenje razmaknica potencijalno ukazuje na izloženost istom stranom genetskom materijalu s obzirom na to da su svi sojevi izolirani iz uzoraka pacijenata KBC-a Zagreb te da pojedini sojevi potječu s istih odjela. Izolat CSKp 53 potječe s pulmološkog odjela kao i izolat CRKp 8 s kojim dijeli 6 razmaknica (Slika 21.). Isto je primijećeno i kod sojeva CSKp 63 i

CRKp 12, koji u lokusima CRISPR3 imaju prve dvije razmaknice iste, a oba soja potječu s kirurškog JIL-a (Slika 23.).

ST14 a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CRKp 8 i 10 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AGAACGAATGCCCGCGCTGGTACGGCGCGTGG TGGATTCC GAGCCTCAAAAATGCACTTTCAGAATGTAA CTGCAAATGTTATATATGCTTACCCAGCGGG ATTGAGCTGAAAAGTCCAGTATCGCGCGGT TGCGCGTCGAAGTGCTGCGCGATAGGATGAT	ST15 b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata 13, 28, 46, 70 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AGAACGAATGCCCGCGCTGGTACGGCGCGTGG TGGATTCCA TGCCGGATATCATACCGCGATTAAACGGCGG CATTATAACAAAACCGCTTTTACTAGATGAG GCGGTGAACCTTGGGGCGTCTCCTCGCGAAT GCTAACAGTGGATAGAGCACTATGTGACGAC GCTACTGCATCCACGGCGTACATGCTCAGTGT TGCACCCCTTCACGCCAAATGCAGCCGATCT	ST101 c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CRKp 12 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AGAACGAATGCCCGCGCTGGTACGGCGCGTGGAT TCCA TGCCGGATATCATACCGCGATTAAACGGCGG CATTATAACAAAACCGCTTTTACTAGATGAG GCGGTGAACCTTGGGGCGTCTCCTCGCGAAT GCTAACAGTGGATAGAGCACTATGTGACGAC GCTACTGCATCCACGGCGTACATGCTCAGTGT TGCACCCCTTCACGCCAAATGCAGCCGATCT GCAGTCGATTCTGCTCGACAGTGACAGGGG
ST23 d) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 41 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AAAAAGTGGCACTGAGTGAAGCCTCTAAGGTC AGGTCCAGTTCGTGCTGCCGATAACGCAGCC GCATGCTTCCACTCCTTTTGGCGCTCACCTTC CTTCGACACCAACCCAAACAGATCTGGCCTGG GTATCGACTTTTACCAGCAGCTCGCCATCG GATAACCCATTTCGCCGCGTATCTTAACAG TGTGTGACAAAGCCACGTCGGGAAGAACAAT	ST35 e) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 42 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA TGGAATTTTCGCGTCTCCAAAACTGCGCATC ATCGCCTACGGTCAATGGCGATCAATTCCTC GCAGGATCTGCTCGAATCAGAGGGCGCGGC GATTTGCTTAGTATCATGGATCACCCCGTTT GCGGACGCGTCCATGAAGTAGTCCGCGAGGT AAACTGCGCATCGTTGACGCGAGCGACATCGA	ST306 f) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 63 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AGAACGAATGCCCGCGCTGGTACGGCGCGTGGGA TTCC ATACCGGCAGCATAACGCGCGTTTTCTGAAT CCGACGCGCGCGCGGCTTTTGCCTGTGCTGAC TGCCTGTGATCTGCGGCGTATCTGGACAGCAG TGTCCCGGATACGCTTCCGCCATTGATGCGC ACCAACATATTGTGAAGAGCG

Slika 23. Prikaz proksimalne razmaknice lokusa CRISPR3 kod sojeva *K. pneumoniae* otpornih i osjetljivih na karbapeneme s obzirom na različitu grupu ST (ST14, ST15, ST101 – CRKp; ST23, ST35, ST306 – CSKp). a) Prikaz lokusa CRISPR3 sojeva CRKp 8 i 10 s konzerviranim setom razmaknica specifičnih za grupu ST14. b) i c) Razmaknice lokusa CRISPR3 sojeva grupe ST15 (13, 28, 46 i 70) i soja CRKp 12 grupe ST101 uz izuzetak posljednje, nehomologne razmaknice soja CRKp 12. d) i e) Prikaz proksimalne razmaknica lokusa CRISPR3 sojeva CSKp 41 (ST23) i 42 (ST35) koja je jednaka kao i kod ostalih lokusa CRISPR3 prikazanih sojeva, ali je ostatak razmaknica "novi" te je posljednja razmaknica nehomologna. f) Istaknute su prve dvije razmaknice soja CSKp 63 (ST306) koje su prisutne u lokusu CRISPR3 većeg broju izolata, dok je ostatak razmaknica "novi". Plava boja – zajednička proksimalna razmaknica sojeva 8, 10, 12, 13, 28, 46, 70, 41, 42 i 63; crvena boja – druga razmaknica koju dijele svi izolati CRKp (8, 10, 12, 13, 28, 70) i izolati CSKp 46 i 63; ljubičasta boja – razmaknice specifične za lokuse CRISPR3 sojeva grupe ST14 (CRKp 8 i 10); narančasta boja – razmaknice specifične za sojeva grupe ST15 i ST101 (12, 13, 28, 46 i 70); roza boja – nehomologne razmaknice sojeva 12, 41 i 42; crna boja – "nove" razmaknice sojeva CSKp 41, 41 i 63 koje nisu pronađene drugdje u sekvenciranim lokusima CRISPR3.

Sekvence direktnih ponavljanja unutar sva tri lokusa CRISPR su specifična za vrstu *K. pneumoniae*, ne pokazujući značajnu homologiju s drugim organizmima. Osim toga, svaka od razmaknica je odvojena jedinstvenom, konzerviranom, direktnom ponavljaćom sekvencom od 28 parova baza (pb) (5'-GTCTTCCCCACACGCGTGGGGGTGTTTC-3') u lokusu

CRISPR1, od 28 pb (5'-GAAACACCCTCACGCAGGTGGGGAAGAC-3') u lokusu CRISPR2 te od 29 pb (5'-GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCT-3') u lokusu CRISPR3. Također, niti jedna razmaknica i niti jedno direktno ponavljanje lokusa CRISPR1 nije bilo pronađeno u lokusima CRISPR2 i/ili 3, i obrnuto.

Korelacija razmaknica lokusa CRISPR s grupom ST i/ili bolničkim odjelom pokazala se otežanom jer nisu svi lokusi CRISPR svih izolata koji sadrže sustav CRISPR-Cas sekvencirani. Na primjer, lokusi CRISPR3 izolata ST35 (42, 65 i 68) pokazali su varijabilan sastav razmaknica – izolat 42 sadržavao je jednu nehomolognu razmaknicu, izolat 65 dvije, a CSKp 68 četiri nehomologne razmaknice (Tablica 17.), što sugerira da im je lokus CRISPR3 zbog varijabilnih razmaknica možda aktivan ili da sojevi nisu klonalno rasprostranjeni unatoč podrijetlu s istog bolničkog odjela (Slika 24.). S druge strane, izolati CSKp 56 (ST2515), 63 (ST306) i 65 (ST35) su imali različite razmaknice u lokusu CRISPR3, izuzev prve proksimalne razmaknice kod sojeva 42 i 48, ali identične razmaknice u lokusu CRISPR2.

Tablica 17. Sekvence nehomolognih razmaknica lokusa CRISPR1 i 3 u usporedbi s profilom osjetljivosti na karbapeneme, grupom ST i bolničkim odjelom.

Lokus CRISPR	Nehomologna sekvenca razmaknice (5' - 3')	Ukupan broj izolata (CSP)	ST grupa	Bolnički odjel
CRISPR3	GCAGTCGATTCGTCTCGACAGTGACAGGGGC	12 (CR)	ST101	Kirurška jedinica intenzivnog liječenja
CRISPR1	TCTTGCTTGGAGAGGATTCTACAGTCTCACCAT	40 (CR)	ST15	Pulmološki odjel
CRISPR1	TACGTCCCGAAGACCACTGCCGGGGGATCAAGG			
CRISPR1	CTGGGGGCAGGACCCCGATATGACGGAGGTGA			
CRISPR3	TGTGTGACAAAGCCACGTCCGGGAAGAACAAT	41 (CS)	ST23	Kirurški odjel
CRISPR3	AAACTGCGCATCGTTTCGACGCGAGCGACATCGA	42 (CS)	ST35	Vanjski pacijent
CRISPR1	CGTGTTTTGTGTTTAATGGTCATTTATGATTT	52 (SC)	ST879	Vanjski pacijent
CRISPR3	ACACGAAATGACGGGGTTTTCGCCGGTCTCTCA	56 (CS)	ST2515	Vanjski pacijent
CRISPR3	CCGGCTACAATGCGATCGGTGGGCAGTGGTTGC			
CRISPR3	AAAACCCAGTAGACGGGGATAGAGACAAAAG	65 (CS)	ST35	Kirurški odjel
CRISPR3	TACGTGGAATACCGTGTGACCAATGAATATG			
CRISPR3	AAATTCAGCAGGTCGCGGGATGCCGTGGTTGT	68 (CS)	ST35	Kirurški odjel
CRISPR3	ACCGCGATCCGTTCCGGCTTAGGCCGTTTAT			
CRISPR3	CCGTCATTCATATTTCCGGGGAAACTGGGTT			
CRISPR3	CAACGAAGTAAACGGGGATCGTCCGTCCAAGA			
CRISPR3	GGCACCCCTTCCGCCCCAAAGGGGCCCTATTCTA			
CRISPR3	AAACCAATCAAAATCTTCCCCACATGGAAAGT-GGCCA	71(CR)	ST15	Internistička jedinica intenzivnog liječenja

CSP (eng. *Carbapenem Susceptibility Profile*) – profil osjetljivosti na karbapeneme

CR (eng. *Carbapenem-Resistant*) – izolati otporni na karbapeneme

CS (eng. *Carbapenem-Susceptible*) – izolati osjetljivi na karbapeneme

a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 42	b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 65	c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 68
TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA	AGATCTACTATGCCCATGCGCAGTCAGCGCCGGT	TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCATA
TGGAATTTTCGCGTCTCCAAAACTGCGCATC	TGCTCTCCTGCGAGATCGTGCGTGCGAACT	AAATTCAGCAGGTGCGGGATGCCGTGGTTGT
ATCGCCTTACGGTCAATGGCGATCATTTCTTC	CTCGGCCGGGCTGAATGCCAGTTACCCAG	GCGATCAGTCAGTCAAACCCGAACAGCGAGC
GCAGGATCTGCTCGAACTCACGAGGGCGCGGC	ACCACTACGCTGATCAGGTACGTGATCCAGTCGG	TAAACGAGCTTTTGTGCGCGCTGCCGGGTT
GATTTGCTTAGTATCATGGATCACCCCGTTT	AAAACCCAGTAGACGGGATAGAGACAAAAG	ACCGCATCCGTTCCGGCTTAGCGCGTTTAT
GCGGACGCGCTCCATGAAGTAGTCCCGCAGGT	CGTTCTCTCGCTGCGTCCAGTTAGCCTCATTT	CCGTCATTATATTCCGGGGAACTGGGTT
AAACTGCGCATCGTTGACGCGAGCGACATCGA	GCGGTATCGCAAGAAGGCCGAGAGCTGGTGAG	TCATAGCCGTTGCTCTGGCAAAAAATAGC
	TACGTGGAATACCGTGTGCACCAATGAATATG	CAACGAAGTAAACGGGGATCGTCCGTCCAAGA

Slika 24. Prikaz tri različita lokusa CRISPR3 izolata CSKp 42, 65 i 68 grupe ST35 koja potiču s kirurških odjela. Plava boja – proksimalna razmaknica lokusa CRISPR3 koju dijeli većina sojeva čiji su se lokusi CRISPR3 sekvencirali; crna boja – "nove" razmaknice kod sva tri izolata koje nisu pronađene drugdje u sekvenciranim lokusima CRISPR3; roza boja – nehomologne razmaknice sojeva 42 i 68; ljubičasta boja – razmaknice lokusa CRISPR3 soja 65 (ST35) koje dijeli sa sojem 56 (ST2515) čiji lokus CRISPR3 je prikazan na slici 26..

Gotovo su svi izolati CRKp iz dominantnih grupa ST14, ST15 i ST101 (8, 10, 12, 13, 15, 28, 40, 70, 71) imali identične lokuse CRISPR1-3, unatoč podrijetlu s različitih odjela. Četiri su izolata činila iznimku: izolat 40 (ST15) posjedovao je tri jedinstvene razmaknice u lokusu CRISPR1, izolati 8 i 10 (ST14) dijelili su međusobno identične razmaknice u lokusu CRISPR3, a izolati 71 (ST15) i 12 (ST101) nosili su dvije, odnosno jednu nehomolognu razmaknicu u lokusu CRISPR3. Ipak, osim navedenih razlika u krajnjim razmaknicama lokusa, izolati su dijelili preostale razmaknice sa skupinom CRKp što je ujedno dokaz da sekvence razmaknica lokusa CRISPR izolata CRKp koreliraju s dominantnim grupama ST specifičnima za određeni vremenski period uzorkovanja (npr. 2021. ili 2022. godinu), ali ne i s lokacijom uzorkovanja. Suprotno izolatima CRKp, izolati CSKp (posebno 41, 42, 52, 56, 65 i 68) su pokazali znatno veću raznolikost razmaknica, čak i unutar iste grupe ST, uključujući i rijetko rasprostranjene ("nove") ili nehomologne razmaknice ponajviše u lokusima CRISPR3, dok je za lokuse CRISPR1 i 2 sojeva ST35 CSKp (posebno 51, 65 i 69) primjećena korelacija razmaknica i sekvencijskog tipa (Slika 25.).

ST35			
a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 51		b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 65	c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 69
CGATATTTACCGGGATTTCAGCCAGCACGCTCG		CGATATTTACCGGGATTTCAGCCAGCACGCTCG	CGATATTTACCGGGATTTCAGCCAGCACGCTCG
CTGTTTCATTGCTCCGATGGCTCGATCTCCGC		CGAGCTCATCGCTCCCTGGAGACGGCGGGCGA	CTGTTTCATTGCTCCGATGGCTCGATCTCCGC
TTTTCGAACGTCATCGACGGCTTTTAGCATTTA		TATAGTATGACGATTGATTCCACTCATCAATT	TTTTCGAACGTCATCGACGGCTTTTAGCATTTA
CATTGGCTGTGGCGCTGGACAATCGGCAAAGG		CAAGACACCTGCAAACGGTATATCTTTGGAGTG	CATTGGCTGTGGCGCTGGACAATCGGCAAAGG
		CTGTTTCATTGCTCCGATGGCTCGATCTCCGC	
		TTTTCGAACGTCATCGACGGCTTTTAGCATTTA	
		CATTGGCTGTGGCGCTGGACAATCGGCAAAGG	
d) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 65		e) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 69	
CCCTTTGCCGATTGTCCAGGCGCCACAGCCAATG		CCTTTGCCGATTGTCCAGGCGCCACAGCCAATG	
TAAATGCTAAAAGCCGTCGATGACGTTTCGAAAA		TAAATGCTAAAAGCCGTCGATGACGTTTCGAAAA	
GCGGAGATCGAGCCATCGGAGCGAATGAAACAG		GCGGAGATCGAGCCATCGGAGCGAATGAAACAG	
CACTCCAAGATATACCGTTTGCAAGGTGCTTG		CGAGCGTGCTGGCTGAAATCCCGGTAAATATCG	
AAATTGATGAGTGGAATCAATCGTCATACTATA			
TCGCCCGCGTCTCCAGGGAAGGCGATGAGCTCG			
CGAGCGTGCTGGCTGAAATCCCGGTAAATATCG			

Slika 25. Prikaz razmaknica lokusa CRISPR1 triju izolata CSKp i razmaknica lokusa CRISPR2 dvaju izolata CSKp svrstanih u grupu ST35. a), b) i c) Prikaz razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 51, 65 i 69. d) i e) Prikaz razmaknica lokusa CRISPR2 izolata CSKp 65 i 69. Zlatna boja – zajedničke razmaknice lokusa CRISPR1 sojeva CSKp 51, 65 i 69 grupe ST35; plava boja – razmaknice koje nisu specifične isključivo za lokus CRISPR1 sojeva grupe ST35, već su pronađene i u lokusu CRISPR1 soja CSKp 63 (ST306); ljubičasta boja – zajedničke razmaknice lokusa CRISPR2 sojeva CSKp 65 i 69 grupe ST35; zelena boja – razmaknice koje nisu specifične isključivo za lokus CRISPR2 sojeva grupe ST35, već su pronađene i u lokusu CRISPR2 sojeva CSKp 56 (ST2515) i 63 (ST306).

Ukupno je identificirano 17 nehomolognih razmaknica (15.5 %, 17/110) – četiri u lokusima CRISPR1 izolata 40 i 52 te 13 u lokusima CRISPR3 izolata 12, 71, 41, 42, 56, 65 i 68, koji su potjecali iz četiri različita bolnička odjela (Tablica 17., Slika 26.). Kod ovih razmaknica nije pronađena podudarnost niti s jednom sekvencom faga, plazmida te bakterijskih ili drugih genoma iz baze podataka GenBank.

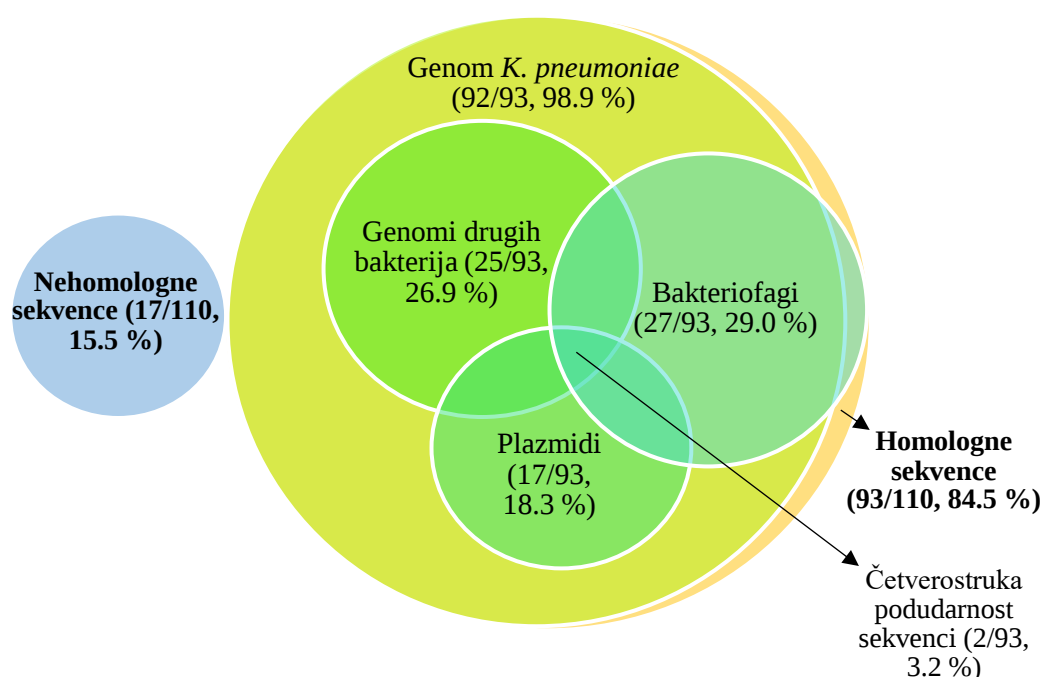
ST23 a) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 41 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AAAAAGTGGCACTGAGTGAAGCCTCTAAGTCT AGGTCCAGTTCGTGCTGCCGGATAACGCAGCC GCATGCTTCCACTCCTTTTGGCGCTCACCTTC CTTCGACCAACCCAAACAGATCTGGCCTGG GTATCGACTTTTACCAGCAGCTCGCCATCG GATAACCAATTCCCGCGTCATCCTAACAG TGTGTGACAAAGCCACGTCCGGGAAGACAAT	ST35 b) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 42 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA TGGAATTTTCGCGTCTCCAAAACTGCGCATC ATCGCCTTACGGTCAATGGCGATCATTTCTCT GCAGGATCTGCTCGAACTCACGAGGGCGCGGC GATTGCTTAGTATCATGGATCACCCCGTTT GCGGACGCGCTCCATGAAGTAGTCCCGCAGGT AACTGCGCATCGTTCGACGCGAGCGACATCGA	ST879 c) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR1 izolata CSKp 52 CGTGTTTTGTGTTTAAATGGTCATTATGATT TCTGCCGGAGAGCGGGAATACTCGTCATTGTCG TCTGCCGGAGAGCGGGAATACTCGTCATTGTCG TGTAGCGCGGCTGGTTGATGCACTGAGGCACTA TGACGATGGCTCTACCGCCCCGCGGGTTCCGG TAGCGTGATCAATAGCATTGTCCAGGTGGGCGT CGAAACCCAGATACCGGTAAGCCAGATTCTGGO CAAATGGGAGAAGCTAATCTGTTGGGGTGCTGAA TATGTTCCAGGCGTTCTATGCCCTGCTGATGC TTCCATCATCTGCGGCGGGATAGCGTGCAGGT
ST2515 d) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 56 AGATCTACTATCGCCATGCGCAGTCAGCGCCGGTA TGCTCTCCTGCGAGATCGTGGCGTGCGAACTC CTCGGCCGGGCTGAATGCCAGTTACCCAGT ACCACTACGCTGATCAGGTACGTGATCCAGTC GCCAGCTCGGTCCGGTGACTTTGGACCCATCG ACACGAAATGACGGGGTTTCGCCGGTCTCTCA CCAGATTTTACAGCGACGTTATTGATCCACTG CCGGCTACAATGCGATCGGTGGGACGTGGTTGC	ST35 e) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 65 AGATCTACTATCGCCATGCGCAGTCAGCGCCGGT TGCTCTCCTGCGAGATCGTGGCGTGCGAACT CTCGGCCGGGCTGAATGCCAGTTACCCAG ACCACTACGCTGATCAGGTACGTGATCCAGTCGG AAAACCCAGTAGACGGGGATAGAGACAAAAG CGTTCTCTCGCTGCGTCCAGTTAGCCTCATT GCGGTATCGCAAGAAGGCCAGAGCTGGTGAG TACGTGGAATACCGTGTGCACCAATGAATATG	ST35 f) Sekvence razmaknica lokusa CRISPR3 izolata CSKp 68 TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA AAATTCAGCAGGTGCGGGATGCCGTGGTTGT GCGATCAGTCAGTCAAAACCCGAACAGCGAGC TAAACGAGCTTTTGTGCGCGCTGCCGGGT ACCGCATCCGTTCCGGCTTAGGCCGTTTAT CCGTCAITCATAATTCGGGGAAACTGGGT TCATAGCCGTTGCTTGGCAAAAATAGC CAACGAAGTAAACGGGATCGTCCGTCGAAGA

Slika 26. Prikaz najraznovrsnijih lokusa CRISPR kod šest izolata CSKp (41, 42, 52, 56, 65 i 68) u kojima su pronađene rijetko rasprostranjene ("nove") i/ili nehomologne razmaknice. Plava boja – proksimalna razmaknica lokusa CRISPR3 sojeva CSKp 41, 42 i 68 koju dijeli većina sojeva sa sekvenciranim lokusom CRISPR3; crna boja – "nove" razmaknice koje nisu pronađene drugdje u sekvenciranim lokusima CRISPR; roza boja – nehomologne razmaknice sojeva 41, 42 i 68; zelena boja – dupla razmaknica soja CSKp 52; ljubičasta boja – četiri proksimalne razmaknice koje dijele isključivo sojevi CSKp 56 i 65.

4.10. Podrijetlo razmaknica lokusa CRISPR

Genomsko podrijetlo razmaknica CRISPR određeno je analizom sličnosti sekvenci razmaknica sa sekvencama plazmida, bakteriofaga ili bakterijskih kromosoma (Slika 27.). Analizirali smo različite sekvence razmaknica ($n = 110$) pomoću baza podataka CRISPRCasFinder, BLASTn GenBank-a te manualno, uz minimalni prag podudarnosti nukleotida od 90.0 %. Kod 93 od 110 razmaknica (84.5 %) je pronađena homologija s već poznatim sekvencama, točnije razmaknice su se podudarale s barem jednom poznatom sekvencom baze podataka GenBank, dok je preostalih 17 razmaknica bilo nehomologno. Od ukupno 93 analizirane homologne razmaknice, 92 (98.9 %) su pokazale podudarnost s kromosomskim regijama bakterije *K. pneumoniae*. Jedina iznimka bila je razmaknica lokusa CRISPR3, sekvence 5'-TGTCCCGGATACGCTTTCCGCCATTGATGCGC-3', identificirana u izolatu CSKp 63. Ova razmaknica nije pronađena u kromosomskim regijama, već isključivo u jednom bakteriofagu, čija je sekvenca pohranjena u GenBank bazi pod pristupnim brojem

OU509537.1. Taj fag sekvenciran je 2021. godine na institutu Wellcome Sanger u Ujedinjenom Kraljevstvu. Daljnja analiza pokazala je da 25 od 93 razmaknica (26.9 %) također imaju sličnosti sa sekvencama drugih bakterijskih vrsta, uključujući sojeve *K. variicola*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella michiganensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella grimontii*, *Citrobacter freundii* i *P. aeruginosa*. Osim toga, 27 razmaknica (29.0 %) pokazalo je sličnost s bakteriofagima, dok je za 17 razmaknica (18.3 %) uočena podudarnost s plazmidnim sekvencama.



Slika 27. Podudarnost sekvenci razmaknica lokusa CRISPR1, 2 i 3 sa sekvencama bakteriofaga, plazmida i bakterijskih genoma pohranjenih u GenBank-u.

Od 93 analizirane homologne razmaknice, dvije sekvence razmaknica (5'-CAAATGGGAGAAGCTAATCGTTGGGGTGCTGAA-3' i 5'-CCGGTTAGCAGGCCGGTGATTGCATTGGAGGC-3') se ističu zbog četverostruke podudarnosti sa sekvencama iz četiri različita izvora: genoma *K. pneumoniae*, genoma drugih bakterija, bakteriofaga i plazmida. Prva razmaknica je pronađena u lokusu CRISPR1 soja CSKp 52 (ST879; vanjski pacijent) koji se ujedno pokazao lokusom s najraznolikijim razmaknicama koje nisu pronađene u ostalim lokusima CRISPR1 sekvenciranih izolata u ovom istraživanju (Slika 26.). Sekvenca ove razmaknice se podudarala s preko 100 različitih sekvenci pohranjenih u GenBank-u, uključujući dva plazmida (CP084855.1 i OW848780.1), jednog bakteriofaga (MK416022.1) te bakterijske sojeve *K. michiganensis* i *K. grimontii*. Druga razmaknica

(5'-CCGGTTAGCAGGCCGGTGATTGCATTGGAGGC-3'), koja je pronađena u lokusima CRISPR2 sojeva 8, 12, 15, 28, 46 i 71, je također podudarna s više od 100 sekvenci, uključujući dva plazmida (CP079158.1 i CP079675.1), tri bakteriofaga *Caudoviricetes* sp. (BK047705.1, BK024839 i BK021869) te bakterijske sojeve *K. variicola* i *K. grimontii*. Ove dvije sekvence razmaknica su pronađene diljem svijeta, uključujući Norvešku, Španjolsku, ali i Južnu Koreju.

Ukupno je 35.6 % (39/110) različitih razmaknica pokazalo podudarnost sa sekvencama bakteriofaga i/ili plazmida (Tablica 18.). Iako je u tablici 18. naveden pristupni broj GenBank-a samo jednog bakteriofaga i/ili plazmida, često je jedna razmaknica lokusa CRISPR1 ili CRISPR3 pronađena u više različitih bakteriofaga i/ili plazmida. Tako je razmaknica 5'-CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG-3', iz lokusa CRISPR1, identificirana kod više od 24 različita plazmida; razmaknica lokusa CRISPR2 5'-CCGGCATCCGTCAGCTCGACGGCCAGCTGCAG-3' pronađena je u više od 14 plazmida; dok je razmaknica lokusa CRISPR3 5'-TGCCGGATATCATCACCGCGATTAAACGGCGG-3' otkrivena kod više od 94 različita plazmida.

Podaci iz GenBank-a također pokazuju da su obje proksimalne razmaknice (5'-TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA-3' i 5'-AGAACGAATGCCCCGCGCTGGTACGGCGCGTCGTGGATTCC-3'), koje su često prisutne u lokusima CRISPR3 izolata ovog istraživanja, ujedno često prisutne i visoko konzervirane u sojevima *K. pneumoniae*. Uz to su obje razmaknice pronađene i na plazmidima (Tablica 18.), a prva razmaknica je pronađena i u lokusu CRISPR soja *K. pneumoniae* iz Rusije. Osim toga, sekvence homolognih razmaknica pronađene su diljem svijeta, a podaci sekvenciranja najčešće potječu iz Norveške, Australije (Melbourne), Sjedinjenih Američkih Država, Kine, Rusije, Ujedinjenog Kraljevstva, Španjolske, Njemačke i Švicarske. Pojedine sekvence razmaknica sojeva CSKp 48, 52 i 63 su podudarne s jako malim brojem izolata *K. pneumoniae* u svijetu. Tako je razmaknica 5'-TGACGATGGCTCTACCGGCCCGGCGGGTTCCGG-3' lokusa CRISPR1 soja 52 (ST879) pronađena kod samo tri soja u Australiji, Norveškoj i Njemačkoj; razmaknica 5'-TCTTAATCTTTTATTAATAGCGTTGGTGAAG-3' lokusa CRISPR2 soja 48 (ST151) kod dva soja *K. pneumoniae* sekvencirana u Norveškoj i Španjolskoj; dok je već spomenuta razmaknica 5'-TGTCCCGGATACGCTTCCGCCATTGATGCGC-3' lokusa CRISPR3, soja 63 (ST306), podudarna samo s jednim bakteriofagom sekvenciranim u Ujedinjenom Kraljevstvu.

Tablica 18. Sekvence razmaknica CRISPR-Cas koje odgovaraju sekvencama plazmida i/ili faga označenih pristupnim brojem.

Lokus CRISPR	Sekvenca razmaknice (5'-3')	Broj izolata	Bakteriofag (pristupni broj)	Plazmid (pristupni broj)
CRISPR1	TGCCTCCAATGCAATCACCGGCTGCTAACCGG	8, 40, 49, 71, 46, 28	BK047705.1	/
	CGTCATCAGCGCCTTGTTCAGCGGCGACCACC	8, 40, 49, 54, 71, 46, 28	NC_071011.1	/
	CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG	8, 49, 53, 54, 71, 46, 28	/	AP024174.1
	TGTAGCGCGGCTGGTTGATGCACTGAGGCACTA	52	MK422452.1	/
	CAAAATGGGAGAAGCTAATCGTTGGGGTGCTGAA	52	MK416022.1	OW848780.1
	TGGTCATCGCGCCCCCTTGGCCTGCTCTGCGCTG	53	MN013086.1	/
	TCCTTCATTAAGTGAGCAATTGCTTCCTTTTTT	53	PP934564.1	/
	CGGCTCTTTTTATCTCCTTCATCCTTCGCTAT	54	BK055976.1	/
	TGATCGGCGTGCCGTTTGTGGACCCGAAATAG	54	BK031684.1	/
	CGAGCTCATCGCCTCCCTGGAGACGGCGGGCGA	63, 65	BK031364.1	/
	CAAGACACCTGCAAACGGTATATCTTTGGAGTG	63, 65	OP617741.1	/
CRISPR2	AGGATAGAGCCAAATCCGCTCACACGTGATGA	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	/	CP079158.1
	CCGGCATCCGTCAGCTCGACGGCCAGCTGCAG	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	/	CP081815.1
	ACGTGATCGCCCTGGCGCGGACGCCGGGAGGT	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	NC_071011.1	CP079158.1
	ATGGTGCGACTGTAGAATCCTCACCATGCACG	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	NC_071011.1	CP079158.1
	GATAATCCCGTCAGGTTGTGACTCTGCACGAT	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	NC_071011.1	CP079158.1
	TCGAGGACATTACCGAGGACTACGACGACTGG	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	BK019580.1	/
	GGTGGTCGCCGCTGGAACAAGGCGCTGATGAC	15, 48, 8, 12, 71, 41, 28, 46	NC_071011.1	CP079158.1
	GACTGGCTCGGCTACGAGGTGCGCTTCGACAC	15, 8, 12, 71, 28, 46	/	CP079158.1
	CCGGTTAGCAGGCCGGTGATTGCATTGGAGGC	15, 8, 12, 71, 28, 46	BK047705.1	CP079158.1
	CTATTTCCGGTCCAACAAACGGCACGCCGATC	41	BK031684.1	CP093490.1
	ATAGCGAAGGATGAAGGAGATAAAAAAGAGCC	41	BK055976.1	/
	CCACTCCAAAGATATACCGTTTGCAGGTGTCTTG	56, 65, 63	OP617741.1	/
	TCGCCCCCGCTCTCCAGGGAGGCGATGAGCTCG	56, 65, 63	BK031364.1	/
CRISPR3	TCCAGTACGCCAATGCTGGTAGACCCCTCACA	8, 10, 12, 13, 28, 41, 42, 46, 63, 68, 70, 71	/	CP183011.1
	AGAACGAATGCCCGCGCTGGTACGGCGCGTCGTG GATTCC	8, 10, 12, 13, 28, 46, 63, 70, 71	/	CP079158.1
	ATTCAGCTGAAAACGTGCCAGTATCGCGGCGGT	8, 10	/	CP079675.1
	TCGCCGTCGAAGTGCTGCGCGATAGGGATGAT	8, 10	/	CP079675.1
	TGCCGGATATCATCACCGCGATTAAACGGCGG	12, 70, 13, 28, 46	/	CP067552.1
	GCTAACCACTGGATAGAGCACTATGTGACGAC	12, 70, 13, 28, 46, 71	BK049466.1	/
	GCTACTGCATCCACGGCGTACATGCTCAGTGT	12, 70, 13, 28, 46, 71	BK052889.1	/
	CTTCGACACCAACCCAAACAGATCTGGCCTGGA	41	BK049466.1	/
	TGGAATTTTCGCGTCTCCAAAACTGCGCATC	42	BK052641.1	/
	GCGGACGCGTCCATGAAGTAGTCCCGCAGGT	42	BK056588.1	/
	CCGAGCCGCGCGGCTTTTGCCGGTGCTGAC	63	MN013086.1	/
	TGCCTGCTGATCTGCGGCGTTATCTGGACAGCAG	63	OR532892.1	/
	TGTCCCGGATACGCTTTCCGCCATTGATGCGC	63	OU509537.1	/
	GCTAACCACTGGATAGAGCACTATGTGACGAC	71	BK049466.1	/
	GCTACTGCATCCACGGCGTACATGCTCAGTGT	71	BK049466.1	/

5. DISKUSIJA

Glavni cilj ovog doktorskog rada je bio istražiti rasprostranjenost kromosomskog imunskog sustava CRISPR-Cas u kliničkih sojeva *K. pneumoniae* izoliranih iz različitih uzoraka bolesnika hospitaliziranih u KBC-u Zagreb pri čemu su uzorci prikupljeni s ukupno 89 različitih odjela. Uz to, nastojali smo ispitati korelaciju između prisutnosti sustava CRISPR-Cas u izolatima *K. pneumoniae* s obzirom na bolničke odjele, vrstu uzoraka, kliničke karakteristike bolesnika iz čijih uzoraka su sojevi *K. pneumoniae* izolirani, profil antimikrobne osjetljivosti na karbapeneme i ostale antimikrobne lijekove, tipove gena *bla* koji kodiraju za karbapenemaze te s obzirom na grupe PFGE i ST kojima izolati pripadaju. Sustavi CRISPR-Cas, kao adaptivni imunski mehanizmi prokariota, predmetom su brojnih istraživanja zbog svoje uloge u obrani od invazivnih genetičkih elemenata poput bakteriofaga i plazmida te potencijalne povezanosti s virulencijom i otpornosti na antimikrobne lijekove. Stoga ovo istraživanje prema našim saznanjima predstavlja prvi nalaz o dinamici sustava CRISPR-Cas tipa I u lokalnoj populaciji izolata *K. pneumoniae* u Hrvatskoj i doprinosi širem razumijevanju uloge sustava CRISPR-Cas u evoluciji i prilagodbi ovog značajnog patogena.

O važnosti patogenih sojeva *K. pneumoniae* govore i podaci iz 2017. godine, prema kojima je u Europi zabilježeno preko 30 000 invazivnih izolata CRKp, dok je do 2019. čak 43.0 % europskih zemalja izvijestilo o regionalnom ili međuregionalnom širenju sojeva CRE (Coppola i sur., 2022.). Posebno je zabrinjavajuća situacija na području Balkana gdje je zabilježena endemska cirkulacija sojeva CRKp koji proizvode karbapenemaze, s naglaskom na klonalno širenje sojeva ST11 koji su vremenom zamijenili sojeve ST258 (Chatzidimitriou i sur., 2024.). Takvi trendovi izravno se preslikavaju i na Hrvatsku, a istraživanje provedeno još 2012. godine je opisalo pojavnost prvih izolata koji su proizvodili NDM-1 i KPC-2 u hrvatskim bolnicama (Zujić Atalić i sur., 2014.). Novija istraživanja pokazuju da je problem danas endemski, s dominacijom sojeva CRKp koji proizvode karbapenemazu OXA-48. Klinički je značajno da su gotovo svi analizirani sojevi CRKp klasificirani kao ekstenzivno otporni sojevi (XDR), što onemogućuje jasnu razliku između bolničkih i izvanbolničkih patogenih sojeva *K. pneumoniae* (Car i sur., 2024.).

Sojevi CRE se definiraju kao sojevi otporni na barem jedan karbapenem, pri čemu je proizvodnja karbapenemaza najčešći mehanizam otpornosti identificiran kod oko 85 % sojeva CRE globalno (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.; Coppola i sur., 2022.). U ovom istraživanju, zbirka sojeva *K. pneumoniae* obuhvaćala je ukupno 400 jedinstvenih izolata (eng. *non-copy*), pri čemu je svaki pojedinačni izolat poticao od drugog bolesnika. Od toga je 200

sojeva CRKp klasificirano kao izolati *K. pneumoniae* otporni na ertapenem koji proizvode barem jednu vrstu karbapenemaza. Budući da je prethodna studija postavila hipotezu da je niska prevalencija sustava CRISPR-Cas povezana s visokom prisutnošću gena otpornosti na antimikrobne lijekove u analiziranim sojevima (Kadkhoda i sur., 2024.), uključili smo kontrolnu skupinu od 200 izolata *K. pneumoniae* osjetljivih na sve promatrane karbapeneme (CSKp) i većinu drugih ispitivanih antimikrobnih lijekova.

Stope otpornosti na ertapenem, meropenem i imipenem iznosile su 50.0 %, 37.0 %, i 26.3 %, redom, a od ukupno 200 izolata CRKp 48.5 % sojeva je bilo otporno na sva tri karbapenema. Otpornost na ertapenem je zabilježena kod svih izolata CRKp, dok je otpornost na meropenem i imipenem uočena u značajno manjem udjelu izolata. Za povećanu otpornost izolata CRKp na ertapenem su vjerojatno zaslužni i drugi mehanizmi otpornosti, uz proizvodnju karbapenemaza, koji dodatno oslabljuju učinkovitost ertapenema, dok meropenem te u većoj mjeri imipenem ostaju djelotvorni (Grundmann i sur., 2010.; Martínez-Martínez 2008.). Veća molekulska masa i negativni naboj ertapenema otežavaju njegov prolaz kroz pore vanjske membrane sojeva *K. pneumoniae*, što dovodi do znatno niže koncentracije lijeka unutar bakterijske stanice. Pri tako smanjenim koncentracijama, čak i umjereno aktivni enzimi poput beta-laktamaza AmpC i ESBL mogu hidrolizirati preostalu količinu ertapenema, učinkovito ga inaktivirajući (Jelić, 2018.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.; Rabaan i sur., 2022). Uz to, izmjene u strukturi i funkciji porina, kao što je gubitak ili inaktivacija porina OmpK35 i OmpK36, značajno umanjuju permeabilnost vanjske stanične membrane za antimikrobne lijekove. Ovi defekti u porinima, posebno kada su udruženi s proizvodnjom karbapenemaza, dovode do sinergijskog pojačanja otpornosti na karbapeneme. Konkretno, u slučaju produkcije beta-laktamaze OXA-48, integritet porina ključan je preduvjet za postizanje klinički značajne razine otpornosti (Wyres i sur., 2020.). Značajan faktor u razvoju otpornosti predstavlja i stjecanje plazmida koji nose gene za već spomenute enzime AmpC i ESBL. Povišena ekspresija tih enzima, zajedno s disfunkcijom porina vanjske membrane, također može sinergijski povišiti otpornost na karbapeneme, što je osobito relevantno za ertapenem (Grundmann i sur., 2010.; Martin i Bachman, 2018.).

Svi izolati CRKp u ovom istraživanju iskazali su fenotip višestruke otpornosti, odnosno pokazali su otpornost na barem jedan antimikrobni lijek iz tri ili više različitih klasa, za razliku od izolata CSKp koji su bili osjetljivi na gotovo sve ispitivane antimikrobne lijekove. Izuzetak čini 9.0 % (13/145) sojeva CSKp otpornih na kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol te 3.5 % sojeva CSKp koji su otporni na oba ispitivana fluorokinolona (ciprofloksacin i

levofloksacin). Uz varijabilnu razinu otpornosti sojeva CRKp na karbapeneme, zabilježena je visoka učestalost otpornosti na gotovo sve ispitivane skupine beta-laktamskih antibiotika, cefalosporina (izuzev novog siderofornog cefalosporina cefiderokola), kombinacije cefalosporina 3. generacije i inhibitora beta-laktamaza (ceftazidim + avibaktam), kombinaciju imipenem + relebaktam, fluorokinolone i kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol. Otpornost na aminoglikozide je zabilježena kod prilično malog broja izolata, pri čemu je otpornost na gentamicin utvrđena kod 31.8 % izolata, dok je na amikacin bilo otporno samo 14.4 % sojeva.

Na temelju pregleda relevantne literature, zapaža se konzistentan profil otpornosti kod izolata CRKp. Taj je profil primarno obilježen iznimno visokom stopom otpornosti na skupine antibiotika iz klase beta-laktama, uključujući peniciline, kombinacije penicilina s inhibitorima beta-laktamaza, cefalosporine prve i druge generacije te cefalosporine proširenog spektra djelovanja (Martínez-Martínez 2008.; Jelić, 2018.; Sheu i sur., 2019.). Literatura također bilježi prisutnost otpornosti na ciprofloksacin, kao i kombinaciju trimetoprima i sulfonamida. Nadalje, otpornost na aminoglikozide pokazuje varijabilnu prirodu. U tom kontekstu, literatura potvrđuje, jednako kao i rezultati ovog istraživanja, češću pojavnost otpornosti na gentamicin u usporedbi s amikacinom (Almaghrabi i sur., 2014.; Zavascki i sur., 2017.; Jelić, 2018.). Stoga se može reći da je visok postotak sojeva CRKp i dalje osjetljiv na amikacin koji može predstavljati važnu terapijsku opciju za infekcije uzrokovane ovim sojevima (Rodrigues i sur., 2021.).

Uz amikacin, sojevi su najveću osjetljivost pokazali na cefiderokol (11.8 %) i kolistin (22.0 %). Kombinirana terapija koja uključuje amikacin i kolistin je u nedavnoj studiji pokazala veću učestalost nefrotoksičnih učinaka u usporedbi s kombiniranom terapijom koja uključuje polimiksin B, zbog čega je pri njezinoj primjeni potreban poseban oprez (Rodrigues i sur., 2021.). Osim toga, sojevi CRE su i u drugim istraživanjima pokazivali smanjenu otpornost na kolistin koji se se dugo smatrao lijekom izbora za infekcije izazvane sojevima CRE. Primjena visokih doza kolistina povezana je s boljim kliničkim ishodima, a moguća je i strategija istovremenog korištenje karbapenema i kolistina u borbi protiv ovih sojeva. Iako veća opservacijska istraživanja ukazuju na potencijalnu korist kombinirane terapije kod pacijenata s teškim infekcijama izazvanim sojevima CRE, nedavno randomizirano kliničko ispitivanje nije pokazalo prednost kombinacije kolistina i meropenema u usporedbi s monoterapijom kolistinom (Sheu i sur., 2019.).

Najveća osjetljivost sojeva CRE *K. pneumoniae* je zabilježena za cefiderokol (11.8 %) iako je ispitivanje uključivalo samo 17 sojeva. Ovi rezultati se podudaraju sa rezultatima studije gdje je 97 % izolata CRE pokazalo osjetljivost na cefiderokol *in vitro* (Hackel i sur., 2018.; Sheu i sur., 2019.). Cefiderokol je inovativni sideroforni cefalosporin koji pokazuje snažnu aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija *in vitro* i *in vivo*, uključujući sojeve CRKp (Saisho i sur., 2018.; Sheu i sur., 2019.). Njegova kateholna bočna skupina veže trovalentno željezo i omogućuje mu ulazak u bakterijsku stanicu putem željeznih transportera, a istovremeno je visoko stabilan na hidrolizu karbapenemazama (Ito i sur., 2016.; Wright i sur., 2017.; Sheu i sur., 2019.). Visoka razina osjetljivosti na cefiderokol u ovoj studiji može sugerirati da bi se ovaj novi antimikrobni lijek mogao koristiti kao obećavajuća alternativa kolistinu i karbapenemima, osobito u tretmanu MDR i XDR fenotipova koji su tipični za patogene sojeva *K. pneumoniae* na globalnoj razini (Alkompoz i sur., 2023.). Iako je istraživanje iz 2025. godine prvo takvo koje je zabilježilo pojavu sojeva CRKp otpornih na cefiderokol u Hrvatskoj, ovaj antimikrobni lijek je jako važan jer je jedan od rijetkih antimikrobnih lijekova djelotvornih protiv metalo-beta-laktamaza (Bedenić i sur., 2025.).

Sinergija beta-laktama s inhibitorima beta-laktamaza omogućava smanjenu primjenu karbapenema kao terapije protiv sojeva MDR te doprinosi suzbijanju širenja sojeva koji proizvode karbapenemaze (Bush i Bradford, 2016.; Ceylan i sur., 2025.). Preciznije, primarna i ključna uloga ove kombinacije lijekova, izuzev ceftolozan + tazobaktam, je suzbijanje sojeva otpornih na karbapeneme (Paul i sur. 2022.). Stoga su se u ovoj studiji pratile i stope otpornosti izolata CRKp na tri kombinacije beta-laktama i inhibitora beta-laktamaza. Stope otpornosti su iznosile 90.8 % za kombinaciju ceftolozan + tazobaktam, 63.6 % za imipenem + relebaktam i 24.9 % za ceftazidim + avibaktam. Ovakve razlike u postotcima odražavaju distribuciju različitih karbapenemaznih gena *bla* među analiziranim izolatima, ali i potencijalnu prisutnosti ostalih gena koji kodiraju za beta-laktamaze. Novi inhibitori beta-laktamaza koji su ispitani u ovoj studiji (avibaktam i relebaktam) ciljaju različite vrste karbapenemaza. Tako avibaktam učinkovito blokira enzime KPC i OXA-48, a relebaktam djeluje samo na karbapenemazu KPC (Sheu i sur., 2019.). S obzirom na to da većina testiranih izolata CRKp proizvodi karbapenemazu OXA-48, povećana osjetljivost sojeva na kombinaciju ceftazidim + avibaktam je očekivana, dok je samo jedan soj koji producira karbapenemazu KPC bio otporan na kombinaciju imipenem + relebaktam, točnije svi ostali testirani sojevi koji proizvode KPC su bili osjetljivi. U nedavnoj studiji iz 2025. godine je također zabilježeno kako ceftazidim + avibaktam pokazuju visoku učinkovitost protiv izolata CRKp koji proizvode OXA-48, što ga

čini održivom opcijom liječenja u okruženjima gdje prevladava ova karbapenemaza (Ceylan i sur., 2025.). Kombinacija ceftolozan + tazobaktam inhibira serinske beta-laktamaze klase A i enzime ESBL. Osim toga pokazuje aktivnost i protiv oksacilinaza klase D, ali ne pokazuje djelotvornost prema karbapenemazama (Cho i sur., 2015.; López i sur., 2021.). Navedene tvrdnje su u skladu s rezultatima ovog rada gdje su sojevi CRKp koji proizvode karbapenemaze pokazali otpornost na ceftolozan + tazobaktam u čak 90.8 % slučajeva. Slično je zabilježeno i u radu iz Turske gdje su svi izolati CRKp bili otporni na kombinaciju ceftolozan + tazobaktam (Ceylan i sur., 2025.). Treba naglasiti i da je od 2025. godine u Hrvatskoj dostupna kombinacija aztreonam + avibaktam koja djeluje na sve vrste karbapenemaza pa je osobito korisna kod sojeva koji proizvode metalo-beta-laktamaze te kombinacije više vrsta karbapenemaza istovremeno (Majdandžić i sur., 2025.).

Ovakva saznanja ističu selektivnu aktivnost antimikrobnih lijekova protiv sojeva CRKp, a visoka otpornost izolata CRKp na većinu ispitivanih antimikrobnih lijekova dodatno naglašava trenutne izazove u upravljanju bolničkim infekcijama (Sheu i sur., 2019.; Russo i sur., 2023.). Profili osjetljivosti na antimikrobne lijekove, s naglaskom na karbapeneme, su u skladu sa istraživanjem iz 2023. godine koja ističe brzu evoluciju i širenje determinanti otpornosti kod patogenih sojeva CRKp putem selektivnog pritiska antimikrobnih lijekova koji potiče pojavu otpornih sojeva zaslužnih za razne infekcije. Točnije, prekomjerna uporaba karbapenema inducira proizvodnju karbapenemaza, česta upotreba jedne klase antimikrobnih lijekova povećava rizik otpornosti na drugu klasu, dok kombinirana i produljena terapija dodatno pojačava selektivni pritisak što omogućuje sojevima CRKp razvoj više različitih mehanizama otpornosti (Lin i sur., 2023.).

Kod 200 sojeva *K. pneumoniae* je detektirana proizvodnja barem jedne od tri klinički najznačajnije karbapenemaze (KPC-2, NDM-1 i OXA-48) iz tri različite klase beta-laktamaza prema Amblerovoj klasifikaciji, što je u skladu s prethodnim literaturnim navodima istraživanja iz 2019., 2023. i 2025. godine (Sheu i sur., 2019.; Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.; Ceylan i sur., 2025.). Najčešća karbapenemaza koju proizvode izolati u našem istraživanju bila je OXA-48 koja je detektirana kod 61.5 % izolata, što je u skladu s prethodnim istraživanjem koje je karbapenemazu OXA-48 proglasilo najdominantnijom karbapenemazom kod enterobakterija u Hrvatskoj, s naglaskom na sojeve *K. pneumoniae* (Bedenić i sur., 2018.). Prema zastupljenosti slijede NDM-1 (26.5 %), kombinacija NDM-1 i OXA-48 (7.0 %) te karbapenemaza KPC-2 (5.0 %). Najučestalija pojavnost sojeva koji proizvode karbapenemazu NDM-1 je u našem istraživanju zapažena u 2022. godini. Ovakvi rezultati nisu neobični s obzirom na to da se

Balkan još od ranije smatra sekundarnim rezervoarom enterobakterija koje proizvode NDM-1. Osim toga, poznato je i da je cijelo mediteransko područje zahvaćeno epidemijom sojeva koji proizvode OXA-48 čiji se geni *bla*_{OXA-48} nalaze na konjugativnim plazmidima IncL/M koji su prvobitno bili endemični za Sredozemlje, a postali su ključni za globalno širenje gena otpornosti među enterobakterijama (Voulgari i sur., 2014.; Acman i sur., 2022.; Berger i sur., 2013.; Poirel i sur., 2012.; Potron i sur., 2013.; Jelić, 2018.). Za razliku od gena *bla*_{OXA-48}, koji se najčešće vežu za samo jedan plazmid, gen *bla*_{NDM-1} je povezan s najmanje 20 različitih tipova plazmida, pretežno IncFIB, IncFII, IncA/C (IncC), IncX3, IncH i IncL/M, uključujući i netipizirane plazmide (Acman i sur., 2022.).

Sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode karbapenemazu OXA-48 su bili najdominantniji u 2023. i 2024. godini gdje je većina izolata proizvodila upravo ovu vrstu karbapenemaze. Osim karbapenemaze OXA-48, uz sojeve *K. pneumoniae* se često veže i proizvodnja karbapenemaze KPC-2 koja je u ovom istraživanju bila detektirana kod samo 10 sojeva iz 2021. godine. Veza između bakterije *K. pneumoniae* i karbapenemaze KPC je poznata još od otkrića enzima KPC u SAD-u 1996. godine (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023.). Nakon toga slijedi klonska ekspanzija soja *K. pneumoniae* ST258 koji nosi plazmid pKpQIL s identificiranim markerom FIBK i genom *bla*_{KPC} (Wyres i sur., 2020.). Problem kod sojeva koji proizvode karbapenemaze jest nekonzistentno ispoljavanje karbapenemske otpornosti. To značajno otežava njihovo otkrivanje i često dovodi do "tihog" širenja ovih otpornih sojeva unutar bolničkih ustanova (Jelić, 2018.).

Pojava kliničkih izolata bakterija koji istovremeno proizvode dvije vrste karbapenemaza, kao što su NDM-1 i OXA-48 u našem istraživanju, jasan je pokazatelj sve veće složenosti mehanizama otpornosti na karbapenemske antibiotike. Važno je naglasiti da fenotip višestruke otpornosti često nije rezultat prisutnosti samo jednog plazmida unutar bakterijske stanice. Ovo je posebno izraženo kod izolata koji proizvode karbapenemazu OXA-48, s obzirom na to da se gen *bla*_{OXA-48} povezuje isključivo s konjugativnim plazmidima IncL/M (Poirel i sur., 2012.; Potron i sur., 2013.) koji rijetko sadrže dodatne gene otpornosti, što upućuje na to da su za višestruku otpornost odgovorni i drugi mehanizmi te prisutnost više različitih plazmida koji nose gene otpornosti. Tako je 2024. godine po prvi put u Hrvatskoj opisana istovremena prisutnost gena *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1} i *bla*_{OXA-48} kod dvaju sojeva *Enterobacter hormaechei* (ST200) (Bošnjak i sur., 2025.). Na našem zavodu opaženi su i sporadični sojevi *K. pneumoniae* s istovremenom prisutnošću gena *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1} i *bla*_{OXA-48} (neobjavljeni podaci). Slično je opisano i u druga dva istraživanja kod soja *K. oxytoca* koji proizvodi KPC-2,

NDM-1 i IMP-4 i soja *C. freundii* koji kodira za karbapenemaze VIM-1, NDM-1 i OXA-48 (Wang i sur., 2017.; Biez i sur. 2022.).

Sojevi CRKp u ovom istraživanju su, ovisno o vrsti karbapenemaze koju proizvode, ispoljavali varijabilan profil otpornosti na karbapeneme. Preciznije, postoji visoko značajna razlika u profilu osjetljivosti na imipenem i/ili meropenem između sve četiri grupe izolata, ovisno o vrsti karbapenemaze/a koju sojevi proizvode. Tako je statistički značajno da niti jedan soj *K. pneumoniae* osjetljiv na imipenem i/ili meropenem ne nosi gen *bla_{KPC}* ($p = 0.0002$), za razliku od gena *bla_{OXA-48}* koji je značajno češće prisutan u takvim sojevima ($p < 0.0001$). Ovom zapažanju ide u prilog i analiza 97 izolata otpornih na sve testirane karbapeneme koja je otkrila sljedeću distribuciju karbapenemaza u tim izolatima: 100 % KPC-2, 39.2 % NDM-1, 39.2 % OXA-48 i 11.3 % NDM-1 + OXA-48. S druge strane, 103 izolata CRKp (51.5 %) su bila osjetljiva na meropenem i/ili imipenem, a kod 82.5 % tih izolata je detektiran gen *bla_{OXA-48}*. Ovakvi rezultati potencijalno ukazuje na smanjenju proizvodnju ili slabiju hidrolitičku aktivnost karbapenemaze OXA-48 u usporedbi s karbapenemazom KPC. Slično je primijećeno i u studiji iz 2016. godine gdje su izolati koji proizvode karbapenemazu OXA-48 pokazivali nižu razinu otpornosti na karbapeneme u usporedbi s izolatima koji proizvode karbapenemazu KPC (Narayanan i sur., 2016.).

Iz dijagnostičke perspektive je važno reći da su rezultati molekularne analize gena *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}* i *bla_{OXA-48}* pokazali usklađenost s ispitivanjem osjetljivosti izolata na karbapeneme metodama disk difuzije i mikrodilucije u bujonu, kao i s rezultatima imunokromatografskog testa kojim je primarno detektirana prisutnost karbapenemaza KPC, NDM i/ili OXA-48. Ovakva konzistentnost naglašava ključnu ulogu gena *bla* kao indikatora u određivanju fenotipa višestruke otpornosti sojeva *K. pneumoniae*, dok sama prisutnost ovih gena potvrđuje da je kod sojeva CRE proizvodnja karbapenemaza najčešći mehanizam otpornosti, a da je proizvodnja beta-laktamaza generalno najznačajniji mehanizam otpornosti na beta-laktame u enterobakterija (Caliskan-Aydogan i Alocilja, 2023; Coppola i sur., 2022).

Nakon šta se utvrdio profil osjetljivosti sojeva na karbapeneme, analiza kliničkih karakteristika je pokazala da je učestalost hipertenzije bila statistički značajno veća kod bolesnika kod kojih su detektirani izolati CRKp (131/200, 65.5 %) u usporedbi s bolesnicima kod kojih su izolirani sojevi CSKp (60/200, 30.0 %) ($p < 0.0001$). U istraživanju Li i sur. je ranije pokazano da je *K. pneumoniae* potencijalno povezana s razvojem hipertenzije, točnije metagenomskom analizom je utvrđeno da se *K. pneumoniae* nalazi u velikom broju u

probavnom sustavu bolesnika s hipertenzijom. Također, inokulacijom *K. pneumoniae* u pokusne miševe pokazano je da se kod njih razvija visoki krvni tlak, suženje arterija i oštećenje crijeva (Li i sur., 2022.). Do danas nema dokaza koji bi ukazivali na kliničku povezanost otpornosti na karbapeneme i razvoja hipertenzije. Veća učestalost hipertenzije kod bolesnika kod kojih su detektirani izolati CRKp može se protumačiti s različitim indirektnim čimbenicima - bolesnici s hipertenzijom, osobito ako je neadekvatno kontrolirana ili povezana s ostalim komorbiditetima (dijabetes, bolesti srca), često borave u zdravstvenim ustanovama te su izloženi različitim postupcima i hospitalizaciji. Ovo povećava rizik za infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi, uključujući i mikroorganizme otporne na karbapeneme. Prema očekivanju, iz sličnih razloga su dijabetes i 30-dnevna smrtnost bili statistički značajno rjeđi kod bolesnika s detektiranim izolatima CSKp.

S obzirom na to da se bakterija *K. pneumoniae* lako širi u bolničkoj sredini i ima velike konjugativne plazmide koji joj pružaju ekološke prednosti za prilagodbu različitim nišama (Ostria-Hernández i sur., 2015.), zanimalo nas je posjeduje li ova bakterija sustav CRISPR-Cas. S jedne strane prethodna istraživanja pokazuju da se prisutnost sustava CRISPR-Cas smanjuje kako raste otpornost na antimikrobne lijekove, od MDR preko XDR pa do PDR sojeva (Alkompoz i sur., 2023.; Owaid i Al-Ouqaili, 2024.), što korelira s ranijim istraživanjima koja povezuju sustave CRISPR-Cas s nižom prevalencijom dominantnih gena otpornosti (Li i sur., 2018.; Liao i sur., 2020.; Wang i sur., 2020.; Montazeri i sur., 2024.). S druge strane, studije također povezuju ove sustave s hipervirulentnim CRKp klonovima koji su povezani sa značajno višim stopama mortaliteta u Kini ili pronalaze varijabilne i često statistički neznačajne razlike pri usporedbi antimikrobne otpornosti između CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata u Egiptu (Liao i sur., 2020.; Alkompoz i sur., 2023.). Upravo su nas ovakva oprečna saznanja potaknula da istražimo dinamiku ovog odnosa unutar lokalne populacije kliničkih izolata *K. pneumoniae* u KBC-u Zagreb. Stoga smo analizirali 200 izolata CRKp otpornih na barem jedan karbapenem s prisutnošću ≥ 1 karbapenemaznih gena *bla* i 200 izolata CSKp osjetljivih na sve karbapeneme, kod kojih nije detektirana proizvodnja karbapenemaza.

Prisutnost domaćinskog gena *rpoB* je bio preduvjet za daljnje analiziranje izolata jer se isti koristio kao marker koji specifično definira soj *K. pneumoniae*, a koji je tijekom kasnije analize još jednom potvrđen i analizom MLST. Gen *cas1* je indikator prisutnosti sustava CRISPR-Cas zbog svoje esencijalne uloge u integraciji razmaknica tijekom faze adaptacije. Ako ovaj gen nedostaje, to može ukazivati na smanjenu sposobnost izolata za stjecanje

imuniteta protiv faga ili plazmida (Kadkhoda i sur., 2024.). S obzirom na to saznanje i na činjenicu da su u ostalim istraživanjima sojevi koji nose gen *cas1* također posjedovali i gen *cas3*, probir smo napravili samo za gen *cas1*. Stoga se na osnovi prisutnosti gena *cas1* kod 15.8 % kliničkih izolata *K. pneumoniae* u našem istraživanju može reći da sustav CRISPR-Cas nije široko rasprostranjen u ovoj bakterijskoj vrsti. Najslićniji rezultati našima su opisani u Kini gdje je zabilježena prevalencije sustava CRISPR-Cas u 14.9 % kliničkih izolata CRKp (Liao i sur., 2020.;). Dosadašnja istraživanja su pokazala da prisutnost sustava CRISPR-Cas u bakteriji *K. pneumoniae* varira, ali da najčešće nije široko rasprostranjen. U jednom od istraživanja je bioinformatičkom analizom sustav CRISPR-Cas otkriven u samo 6 od 52 genoma *K. pneumoniae* (Ostria-Hernández i sur., 2015.), dok su druga istraživanja zabilježila prevalenciju ovog sustava od oko 14.9 % do 44.3 % (Liao i sur., 2020.; Owaid i Al-Ouqaili, 2024.; Kadkhoda i sur., 2024.; Alkompoza i sur., 2023.; Hu i sur., 2023.; Wang i sur., 2020.; Li i sur., 2018.). Ograničena distribucija može biti posljedica snažnog selektivnog pritiska za stjecanje gena otpornosti ili virulencije, što može dovesti do gubitka sustava CRISPR-Cas (Kadkhoda i sur., 2024.). Također, sam sustav CRISPR-Cas može biti "pokretni genetski element" čija distribucija ovisi o pripadnoj grupi ST i nije slučajna (Liao i sur., 2020.; Kadkhoda i sur., 2024.), kako je i dokazano u ovom istraživanju, pogotovo u slučaju izolata CRKp.

Sustavi CRISPR-Cas identificirani u ovom radu dosljedno su integrirani na specifičnim genomskim lokusima. Dokaz tome je da su se početnice specifične za pojedine lokuse vezale za točno određeno područje u genomu u slučaju da soj ima neki od lokusa CRISPR, što se naknadno potvrdilo i sekvenciranjem lokusa. PCR produkti sva 3 lokusa CRISPR su nerijetko bili varijabilnih veličina, kako je zabilježeno i u ranijim istraživanjima (Wang i sur., 2020.). Na primjer, sojevi CRKp 8 i 10 su pokazivali različite veličine parova baza (pb) na agaroznom gelu (1800 i 1200 bp, redom), ali su dijelili identične sekvence razmaknica unutar lokusa CRISPR3. Ovo upućuje na to da različite duljine u parovima baza inherentno ne ukazuju na divergenciju sadržaja razmaknica, dok identične veličine često sugeriraju sličnost razmaknica. Bioinformatička analiza Ostria-Hernández i sur. je među prvima otkrila prisutnost sustava CRISPR-Cas u malom broju genoma *K. pneumoniae*, a kod genoma gdje je sustav pronađen, on se također nalazio na istom mjestu u svim genomima, kao što pokazuju i rezultati našeg istraživanja. Na temelju rezultata prethodno opisanih studija, može se reći da se položaj sustava CRISPR-Cas razlikuje ovisno o bakterijskoj vrsti, točnije da se sustav nalazi na istom mjestu u genomu među sojevima iste vrste (Ostria-Hernández i sur., 2015.).

Nedugo nakon, Shen i sur. su identificirali tri različita sustava CRISPR-Cas kod roda *Klebsiella*, uključujući novootkriveni podtip I-E* koji se od "starog" podtipa I-E razlikuje u rasporedu gena *cas*, proteinima Cas, strukturi tracrRNA te sekvencama PAM (Shen i sur., 2017.). Potom su Li i sur. 2018. godine potvrdili postojanje tipova I-E i I-E* kod kliničkih sojeva *K. pneumoniae* koji se mogu razlikovati na temelju sekvenci aminokiselina u proteinima Cas1 i Cas3 te različitih lokacija gena *cas1* i *cas3* na kromosomu (Li i sur., 2018.). U našem istraživanju, iako nismo eksplicitno tipizirali proteine Cas, prisutnost barem jednog od tri različita lokusa CRISPR (CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3) sugerira složenost ovih sustava. S obzirom na to da su kod većine sojeva detektirana sva tri lokusa, samim tim su detektirana i oba podtipa sustava CRISPR-Cas (I-E i I-E*). Točnije, sojevi s CRISPR-Cas podtipom I-E su imali lokus CRISPR1, dok su sustavi podtipa I-E* imali lokuse CRISPR 2 i/ili 3, što se podudara i s nizom ostalih istraživanja koja su pokazala da sustav CRISPR-Cas podtipa I-E ima različite lokuse CRISPR od sustava CRISPR-Cas podtipa I-E* (Shen i sur., 2017.; Li i sur., 2018.; Liao i sur., 2020.; Wang i sur., 2020.). Gotovo su svi CRISPR-Cas pozitivni izolati (93.3 %) u ovom radu imali prisutna oba podtipa. Slično je zabilježeno i u rezultatima istraživanja u Kini, gdje su Hu i sur. također uočili koegzistenciju podtipova I-E i I-E* što je rijetko zabilježeno u ostaloj relevantnoj literaturi (Hu i sur., 2023.). U nekoliko studija je zabilježena veća prevalenciju podtipa I-E među analiziranim izolatima *K. pneumoniae*, dok je podtip I-E* bio češći u svim ostalim istraživanjima, pogotovo onima iz Kine (Alkompoza i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.; Li i sur., 2018.; Liao i sur., 2020.; Hu i sur., 2023.). Ove razlike mogu odražavati geografsku varijabilnost ili specifičnosti analiziranih izolata (Kannadasan i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.).

Izuzev 56 izolata *K. pneumoniae* kod kojih su pronađena oba podtipa, kod tri izolata CSKp je pronađen samo lokus CRISPR1 (podtip I-E), dok je kod samo jednog izolata CRKp utvrđeno prisustvo lokusa CRISPR3 (podtip I-E*). Sustav CRISPR-Cas je pronađen kod 27 sojeva CSKp i 36 sojeva CRKp, pri čemu nije bilo statistički značajne razlike u prevalenciji sustava CRISPR-Cas između izolata CSKp i CRKp. Niska zastupljenost ovog sustava kod izolata CRKp (14.9 %) je zabilježena i u već spomenutom istraživanju u Kini (Liao i sur., 2020.). Zanimljivo je da je zabilježena pojavnost tri izolata CSKp kod kojih je pronađen samo gen *cas1* bez pripadnih lokusa. Ovo može ukazivati na gubitak lokusa zbog delecije ili samociljajućih razmaknica (eng. *self-targeting spacers*) te na prisutnost alternativnog sustava CRISPR-Cas, poput tipa IV na plazmidima, za koji se smatra da nema gene koji kodiraju za proteine Cas1 i Cas2 pa ih onda "posuđuje" (Shen i sur., 2017.; Newire i sur., 2020.; Makarova

i sur., 2013.; Rath i sur., 2015.). Suprotno našem istraživanju, Alkompoz i sur. su kod 3 % sojeva identificirali samo lokus CRISPR, bez klastera gena *cas* sugerirajući da bi ova pojava također mogla biti posljedica gubitka gena zbog prisutnosti samociljajućih razmaknica (Alkompoz i sur., 2023.; Shen i sur., 2017.). U prilog ovoj hipotezi ide i istraživanje koje je pokazalo da je više od polovice samociljajućih razmaknica povezano s gubitkom endogene aktivnosti CRISPR (Stern i sur., 2010.; Alkompoz i sur., 2023.).

Odnos između sustava CRISPR-Cas i otpornosti na antimikrobne lijekove je kompleksan i često kontradiktoran u znanstvenoj literaturi. Usporedba antimikrobne otpornosti kod CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata u ovom istraživanju je otkrila razlike koje uglavnom nisu bile statistički značajne, iako je općenito veća stopa antimikrobne otpornosti uočena kod izolata sa sustavom CRISPR-Cas. Ovaj atipičan trend je bio vidljiv kod više antibiotika uključujući kolistin, ceftazidim + avibaktan, imipenem, trimetoprim + sulfametoksazol i meropenem (Tablica 14.). Jedina statistički značajna razlika uočena je kod kombinacije imipenema i relebaktama, gdje su CRISPR-Cas negativni izolati pokazali značajno veću otpornost (73.3 %) u usporedbi s pozitivnima (42.9 %). Zanimljivo je da je istraživanje Alkompoza i sur. prilikom usporedbe osjetljivosti na različite antimikrobne lijekove između CRISPR-Cas pozitivnih i negativnih izolata dala varijabilne rezultate, pri čemu razlike uglavnom nisu bile statistički značajne. Tako su CRISPR-Cas negativni izolati imali iste ili više stope otpornosti za beta-laktame, amikacin, ciprofloksacin, nitrofurantoin, trimetoprim + sulfametoksazol, dok su CRISPR-Cas pozitivni izolati pokazali niže postotke za gentamicin, tetraciklin, kloramfenikol, tigeciklin, kolistin. Dodatan odmak od našeg istraživanja, ali i istraživanja Alkompoza i sur., je studija iz Kine koja je utvrdila potpunu osjetljivost na karbapeneme i ciprofloksacin među izolatima pozitivnima na sustav CRISPR-Cas (Wang i sur., 2020.). Slično tome, studija provedena u SAD-u izvijestila je da su svi testirani sojevi *K. pneumoniae* s prisutnim sustavom CRISPR-Cas bili osjetljivi na karbapeneme i sve ostale ispitivane antimikrobne lijekove (Mackow i sur., 2019.; Alkompoz i sur., 2023.).

Ono što je neobično je učestalija, iako i dalje rijetka pojavnost sustava CRISPR-Cas kod izolata CRKp koji su nosili barem jedan gen *bla*, u usporedbi s izolatima CSKp kod kojih isti geni nisu detektirani. Naime, očekivalo se da će s većom pojavnosti gena otpornosti na antimikrobne lijekove, pojavnost sustava CRISPR-Cas biti manja zbog selektivnog pritiska koji omogućava da bakterije koje nose gene otpornosti postaju dominantnije pri čemu bi im sustav CRISPR-Cas potencijalno bio "smetnja". Preciznije, prisutnost sustava CRISPR-Cas trebala bi

biti u većoj korelaciji s osjetljivim sojevima kojima je zapravo takav tip imunološkog potencijalno potrebniji kako bi se bakterije "obranile" od invazivnih stranih genetskih elemenata (u prvom redu bakteriofaga), ali i kako bi regulirale konstantni "protok" stranog genetskog materijala na plazmidima. Stoga bi se dalo pretpostaviti da osjetljivi sojevi zbog slabije izloženosti MGE-u vjerojatno ne koriste u tolikoj mjeri sustav CRISPR-Cas pa je samim time evolucijski eliminiran, ili u većoj mjeri koriste neki drugi obrambeni mehanizam poput sustava R-M tipa I za koji se pretpostavlja da je u korelaciji sa sustavom CRISPR-Cas kod sojeva *K. pneumoniae* (Li i sur. 2025.).

Sustav CRISPR-Cas kod izolata CRKp s višestruko otpornim fenotipom može doći i kao "smetnja" u rasprostranjivanju gena otpornosti putem plazmida te je možda i iz toga, izolirano gledano, slabo rasprostranjen kod izolata CRKp u ovom istraživanju. Stoga su i bolesnici iz čijih uzoraka su izolirani sojevi s podtipovima sustava CRISPR-Cas pokazali paradoksalno veću učestalost hipertenzije, malignih bolesti i dijabetesa s obzirom na to da je sustav češće nađen kod izolata koji su otporni na karbapeneme. Slično je zapaženo i u studiji Liao i sur. gdje je kod bolesnika iz čijih uzoraka su izolirani sojevi *K. pneumoniae* sa sustavom tipa I-E* zabilježena značajno viša stopa mortaliteta i boravka na JIL-u u usporedbi s bolesnicima koji nisu imali sustav CRISPR-Cas. Daljnjom analizom je utvrđeno da su ovi izolati *K. pneumoniae* rasprostranjeni klonalno te da posjeduju plazmide virulencije pLVPK za razliku od izolata s podtipom I-E ili izolata koji ne posjeduju sustav CRISPR-Cas te su stoga svrstani u manju skupinu hipervirulentnih klonova s podtipom I-E* (Liao i sur., 2020.).

Molekularne analize u ovoj studiji ukazuju na to da je među izolatima CRKp s detektiranim genima za karbapenemaze, gen *bla_{OXA-48}* bio značajno češći kod CRISPR-Cas negativnih sojeva. Gen *bla_{OXA-48}* isključivo je povezan s konjugativnim plazmidima IncL/M (~ 60 kb), koji rijetko sadrže dodatne gene otpornosti (Berger i sur., 2013.), što sugerira da odsutnost sustava CRISPR-Cas tipa I potencijalno ima negativan utjecaj na stjecanje gena otpornosti koji se nalaze na plazmidima IncL/M, što rezultira povećanim stjecanjem gena *bla_{OXA-48}* u usporedbi sa sojevima koji imaju sustav CRISPR-Cas. Istraživanje u Kini također je otkrilo da je dominantni gen *bla_{KPC-2}* bio najčešći kod CRISPR-Cas negativnih sojeva u usporedbi s onima s podtipom I-E ili I-E* (Liao i sur., 2020.). Nasuprot tome, geni *bla_{NDM-1}* i *bla_{KPC-2}* u našoj studiji su značajno ($p < 0.0001$) češće detektirani u CRISPR-Cas pozitivnim izolatima s oba podtipa (I-E i I-E*) nego u izolatima koji nemaju sustav CRISPR-Cas. Isto je

opaženo i u drugoj znanstvenoj literaturi čiji su rezultati pokazali da je značajno veća učestalost gena *bla*_{NDM-1} u izolatima CRKp koji nose podtip I-E (Kadkhoda i sur., 2025.).

U našem je istraživanju zanimljiv bio slučaj izolata CSKp 46 (ST15) koji je imao oba podtipa (I-E i I-E*), ali je, unatoč tome što je bio osjetljiv na karbapeneme i nije nosio plazmidno posredovane gene *bla*, imao CRISPR profil sličan izolatima CRKp grupe ST15. Ovo bi moglo ukazivati na to da je sustav CRISPR-Cas u izolatu CSKp46 potencijalno aktivan protiv drugih MGE-ova, ali da do stjecanja plazmida s genima otpornosti na karbapeneme (još) nije došlo, ili da su ti plazmidi eliminirani. Također, većina je izolata CRKp grupe ST14, ST15 i ST101 imala homogene profile lokusa CRISPR, što sugerira da prisutnost razmaknica ovih lokusa nije spriječilo stjecanje gena *bla*_{KPC-2} i *bla*_{NDM-1}, ali je zato uspješno spriječeno stjecanje gena *bla*_{OXA-48}. Potencijalni razlog zašto sustav CRISPR-Cas ne sprječava stjecanje pojedinih gena *bla* kod sojeva CRKp može biti povezan s mehanizmom regulacije sustava CRISPR-Cas koji je posredovan imipenemom. Pri visokim koncentracijama, imipenem aktivira protein H-NS (eng. *Histone-like Nucleoid Structuring*) koji se veže na promotor operona CRISPR-Cas, inhibirajući njegovu aktivnost i suprimirajući ekspresiju gena *cas3* (Lin i sur., 2016.). S obzirom na to da je najčešće upotrebljavani karbapenem u KBC-u Zagreb meropenem, dok se imipenem rjeđe daje bolesnicima kao terapija, ne može se sa sigurnošću reći da je mehanizam aktiviranja H-NS-a posrijedi kod izolata CRKp analiziranih u ovom istraživanju.

Na temelju dobivenih rezultata, nije pronađena značajna razlika između prisutnosti sustava CRISPR-Cas u izolata otpornih i osjetljivih na karbapeneme što je u suprotnosti s predloženom prvom hipotezom. U slučaju gena *bla*, hipoteza H1 se potvrđuje jer je gen *bla*_{OXA-48} bio statistički značajno češći u CRISPR-Cas negativnim izolatima CRKp, a geni *bla*_{NDM-1} i *bla*_{KPC-2} u CRISPR-Cas pozitivnim izolatima CRKp. Odsutnost dominantnih gena *bla* u CRISPR-Cas pozitivnim sojevima je primijećena i ovom istraživanju, ali i većini ostalih istraživanja koja su također proučavala kliničke izolate *K. pneumoniae* (Alkompoza i sur., 2023.). Stoga se može reći da je koegzistencija sustava CRISPR-Cas i brojnih gena otpornosti na antibiotike u sojeva *K. pneumoniae* složenija od jednostavnog inverznog odnosa. Tako su Alkompoz i sur. otkrili da su specifični karbapenemazni geni, kao što su *bla*_{VIM} i *bla*_{NDM}, prevalentniji u CRISPR-Cas pozitivnim sojevima, dok su drugi (npr. *bla*_{KPC}) češći u CRISPR-Cas negativnim genomima (Alkompoza i sur., 2023.). Ovi nalazi ukazuju na to da CRISPR-Cas posredovana "supresija" karbapenemaznih gena vjerojatno ovisi o samom lokusu CRISPR i značajkama plazmida, gdje nepotpuni lokusi ili specifične sekvence PAM mogu poremetiti

adaptivnu interferenciju (Lin i sur., 2016.). Također, pojavljuju se i kontrastni obrasci specifični za vrstu. Tako primjerice CRISPR-Cas korelira sa smanjenom antimikrobnom otpornošću u bakterija *P. aeruginosa* i *E. faecalis*, ali povišenom antimikrobnom otpornosti u bakterije *Campylobacter jejuni* (Shen i sur., 2017.; Wang i sur., 2020.; Kadkhoda i sur., 2024.).

U ovoj je studiji istražena i hipermukoviskoznost (HMV) sojeva koji su imali sustav CRISPR-Cas. *String* testom je HMV fenotip utvrđen kod malog broja CRISPR-Cas pozitivnih izolata pri čemu se izolati CRKp i CSKp nisu statistički značajno razlikovali. Razlog tomu je vjerojatno to što su izolati pohranjeni u hranjivom mediju na - 80 °C kroz duži vremenski period te svaka ponovna subkultivacija potencijalno može utjecati na HMV fenotip. Osim toga, HMV je česta karakteristika hipervirulentnih sojeva *K. pneumoniae* (Chang i Ong, 2022.). Istraživanje provedeno 2024. godine u Hrvatskoj je također zabilježilo nisku pojavnost HMV fenotipa kod 9.5 % (19/200) analiziranih izolata CRKp, od čega su samo četiri izolata CRKp imala HMV genetske determinante (Pristas i sur., 2024.). Svakako bi bilo zanimljivo usporediti pojavnost sustava CRISPR-Cas s genima virulencije te HMV fenotipom budući da je istraživanje iz 2025. godine zabilježilo da su izolati CRKp koji sadrže sustav CRISPR-Cas imali veću učestalost gena virulencije te da su bili umjereni ili jaki proizvođači biofilma (Kadkhoda i sur. 2025.).

Ono što je svakako bilo neophodno u ovom istraživanju jest provjeriti je li došlo do klonalne ekspanzije sojeva i pripadaju li sojevi koji imaju sustav CRISPR-Cas istoj grupe ST. Stoga je genomska povezanost izolata istražena metodama PFGE, MLST i analizom razmaknica lokusa CRISPR1-3. Analizama molekularne epidemiologije izolata *K. pneumoniae* sa sustavom CRISPR-Cas, utvrđen je veći broj PFGE i MLST grupa, ponajviše kod izolata CSKp, što ukazuje na filogenetski nepovezane sojeve ili na poliklonsko širenje sojeva CSKp. Ipak, unatoč primijećenom poliklonskom širenju sojeva osjetljivih na karbapeneme, jasno je da je za širenje otpornosti na karbapeneme odgovorna proliferacija specifičnih klonova CRKp koji proizvode karbapenemaze. Takvim se sojevima nerijetko pripisuje izrazito monoklonski karakter, kao što je potvrđeno i u ovoj studiji, prvenstveno kod sojeva ST101 iz 2021. godine i ST15 iz 2022. godine. Stoga u ovom istraživanju nismo mogli donijeti generalan zaključak za sve sojeve *K. pneumoniae* jer smo promatrali samo 63 soja koja su imala sustav CRISPR-Cas (27 CSKp i 36 CRKp sojeva), a kod kojih je uočeno i poliklonsko i monoklonsko širenje.

Analize PFGE i MLST provedene na CRISPR-Cas pozitivnim izolatima CRKp pokazale su smanjenu genomsku raznolikost u odnosu na CSKp izolate. Većina CRKp izolata grupirana je u dva glavna PFGE klastera (001 i 003) što odgovara dvjema glavnim grupama ST

(ST101 i ST15). Specifično, klonski tip ST15 bio je usko povezan s prisutnošću gena *bla*_{NDM-1}, dok je klonski tip ST101 bio povezan s prisutnošću gena *bla*_{KPC-2}. Stoga se može reći da su specifično ovi izolati dokaz monoklonskog širenja. U radu iz 2018. godine su također analizirani klinički sojevi, izolirani iz različitih uzoraka diljem Hrvatske tijekom 2011. i 2012. godine, koji su bili indikatori nadolazeće monoklonske bolničke epidemije karbapenemaze KPC-2 u Hrvatskoj, a pripadali su isključivo visoko rizičnom klonalnom tipu ST258 (Jelić, 2018.). Iako se klonalni kompleks 258 smatrao glavnim pokretačem epidemije KPC-producirajućih sojeva, najnoviji podaci mijenjaju tu sliku, osobito u Europi (Wyres i sur., 2020.). Preciznije, nedavno istraživanje je pokazalo da je mali broj visokorizičnih klonova bio zaslužan za širenje gena *bla* gdje je gotovo 70 % svih analiziranih izolata *K. pneumoniae* bilo koncentrirano u samo četiri klonalne linije: ST11, ST15, ST101 te ST258/512 (David i sur., 2019.). Ovo saznanje se podudara s našim istraživanjem budući da su sojevi koji proizvode KPC-2 svrstani u grupu ST101. Dakle postoji mogućnost da je u nekom trenutku od 2011. do 2021. godine došlo do poliklonskog širenja već prisutnog soja te je, barem u KBC-u Zagreb, soj ST101 postao dominantan proizvođač karbapenemaze KPC-2. ST101 je u nedavom istraživanju u Hrvatskoj opisan kao najzastupljeniji klon kod kojeg je potvrđena istovremena prisutnost gena otpornosti na karbapeneme i gena virulencije (Pristas i sur., 2024.). Stoga pronalazak KPC-producirajućih klonova ST101 u KBC-u Zagreb nije samo lokalna specifičnost, već je odraz šire europske epidemiološke slike.

U skladu s prethodnim studijama, niti jedan od CRISPR-Cas pozitivnih izolata u našoj studiji ne pripada visokorizičnom klonalnom kompleksu 258 koji je bio odgovoran za gotovo dvije trećine globalnih epidemija *K. pneumoniae* kod ljudi (Li i sur., 2018.; Alkompoza i sur., 2023.; Hu i sur., 2023.). Stoga se može reći da se sustav CRISPR-Cas u sojevima ovog klonalnog kompleksa evolucijski nije održao ili da nije niti bio prisutan. Osim toga, u našem istraživanju je kod sojeva CRKp izoliranih 2022. godine tijekom pandemije COVID-19, koji su producirali metalo-beta-laktamazu NDM-1, zabilježena učestala pripadnost grupi ST15. Značajno je da su sojevi ST15 CRKp uglavnom izolirani iz pacijenata s COVID-19 odjela i COVID-19 JIL-a (34.8 %), što naglašava epidemiološki značaj ove linije. Ovaj nalaz se slaže sa studijom iz 2016. godine, provedenoj u Hrvatskoj, koja je već tada specifično opisala dva ST15 izolata koji proizvode NDM-1 (Kocsis i sur., 2016.). Zanimljivo je da su karbapenemazu OXA-48 proizvodila samo tri CRISPR-Cas pozitivna izolata CRKp koja su pripadala grupi ST14, ST15 i ST392, odnosno pulсотipovima 016, 012 i 013. Osim toga je soj CRKp 14, koji proizvodi dvije vrste karbapenemaza (NDM-1 i OXA-48), svrstan u grupu ST15 kao i soj CRKp

71, koji proizvodi samo karbapenemazu OXA-48, ali razlika je ipak vidljiva u pulsotipovima te je soj 14 svrstan u PFGE grupu 013, a soj 71 u PFGE grupu 012. Dakle ovo je samo jedan od primjera gdje se metoda PFGE ipak pokazala specifičnijom od metode MLST što je i razlog zašto se za primarni probir sojeva odabrala metoda PFGE.

Promatrajući CRISPR-Cas pozitivne izolate CSKp uočeni su različiti obrasci genetičke varijabilnosti što sugerira da se izolati, koji ne produciraju karbapenemaze i nisu otporni na karbapeneme, moraju razmatrati na razini pojedinačnog bakterijskog soja. Stoga nije moguće donositi generalne zaključke o klonalnom širenju na razini pojedinačnih izolata *K. pneumoniae*. Detaljna analiza izolata CSKp pokazala je poliklonsku sliku koja se sastoji od čak 14 klonskih tipova: ST35, ST23, ST15, ST13, ST111, ST151, ST866, ST879, ST1391, ST1414, ST381, ST306, ST2515 i ST3661. Zanimljivo je da se pet izolata iz grupe ST35 (51, 55, 58, 59, 68) povezuje s tri različita makrorestriksijska pulsotipa (0001, 0008 i 0011) što je još jedan dokaz epidemiološke važnosti analize sojeva metodom PFGE. Osim toga, izolati CRKp 11 (ST347), 20 (ST147) i 39 (ST392) su, unatoč proizvodnji karbapenemaza, pokazali PFGE i MLST profile najslabije osjetljivim sojevima CSKp 49 (NT), 53 (ST111) i 52 (ST879). Dakle, može se pretpostaviti da su sojevi CRKp 11, 20 i 39 stekli gene *bla* nedavno. Generalno je najviše CRISPR-Cas pozitivnih izolata vezano uz internističke odjele, kirurške jedinice intenzivnog liječenja i vanjske pacijente s dominantnim grupama ST15, ST101 i ST35, redom.

Kada je riječ o lokusima CRISPR, može se reći da razmaknice istih pružaju "povijesni" pregled o prethodnim "invazijama" bakteriofaga ili plazmida, odnosno o izloženosti bakterije specifičnim stranim genetskim elementima (Marraffini, 2010.; Ostria-Hernández i sur., 2015.). U našoj studiji je identificirano 110 različitih razmaknica unutar 40 sekvenciranih lokusa, s varijabilnim brojem (3-10) razmaknica po lokusu i umjerenom raznolikošću sekvenci. Duljina direktnih ponavljanja u našim izolatima bila je 28 pb za lokuse CRISPR1 i CRISPR2 te 29 pb za lokus CRISPR3, a sekvence direktnih ponavljanja su bile specifične za vrstu *K. pneumoniae* i jedinstvene za svaki lokus, bez preklapanja razmaknica ili direktnih ponavljanja između različitih lokusa. Ostria-Hernández i sur. su također zabilježili duljinu sekvenci direktnih ponavljanja od 29 do 30 pb kod sojeva *K. pneumoniae*, što je također u skladu s ostatkom relevantne literature koja je zabilježila raspon dužine direktnih ponavljanja od 21 do 48 pb za bakterije. Veličina razmaknica u našoj studiji je varirala, ali je prosječna veličina bila kao i u istraživanju Ostria-Hernández i sur., odnosno 33 pb što je unutar raspona veličine od 26 do 72 pb, kako je zabilježeno i u prethodnim istraživanjima (Ostria-Hernández i sur., 2015.). Nakon

detaljne analize svake pojedinačne razmaknice lokusa CRISPR1, 2 i 3, može se reći da odsutnost identičnih razmaknica između podtipova I-E i I-E* u ovom istraživanju dodatno upućuje na razlike u specifičnosti adaptacije, dok očuvanost oba podtipa, I-E i I-E*, među udaljenim sojevima *K. pneumoniae*, u smislu pripadnosti udaljenim grupama ST, ukazuje i na potencijalno stjecanje ovog sustava putem HGT-a.

Naša analiza pokazala je da 84.5 % (97/110) homolognih razmaknica odgovara prvenstveno kromosomskim regijama *K. pneumoniae* (99.0 %), a samo jedna homologna razmaknica je pronađena isključivo kod bakteriofaga (1.9 %). Manji udio homolognih razmaknica je ujedno pronađen i na plazmidima (18.3 %), drugim bakterijskim vrstama (26.9 %) te fagima (29.0 %), što pokazuje određena odstupanja u odnosu na prethodne studije. Primjerice, studija iz 2016. godine je zabilježila da je približno trećina analiziranih razmaknica bila homologna plazmidima, fagima ili drugim bakterijskim genomima (Lin i sur., 2016.). S druge strane, Shen i sur. su izvijestili da je čak 90 % razmaknica pokazalo podudarnost s MGE-ovima poput faga, profaga i plazmida. Osim toga, sekvence većeg broja razmaknica u našoj studiji su podudarane sa sekvencama različitih plazmida što ukazuje na ulogu lokusa CRISPR u obrani od širokog spektra plazmida. Posebno je zanimljiva identifikacija 17 (15.5 %) nehomolognih/nepoznatih razmaknica za koje nije pronađena podudarnost u bazama podataka GenBank-a. Ove nehomologne razmaknice mogle bi predstavljati nedavne interakcije s još nekarakteriziranim MGE-ovima ili imati druge, još nepoznate funkcije.

Dvije razmaknice u našoj studiji su pokazale četverostruku homologiju s genomom raznih sojeva *K. pneumoniae*, genomima drugih enterobakterija te sekvencama faga i plazmida. Ovo saznanje predstavlja ekstreman primjer na kojem se može objasniti što sve može stajati u pozadini homolognih razmaknica. Postoji mogućnost da ove dvije razmaknice predstavljaju česte mete ili ključne regije uključene u horizontalni prijenos gena. Činjenica da su ove sekvence ugrađene kao razmaknice u lokuse CRISPR1 i 2 u izolatima *K. pneumoniae* sugerira da su sojevi u nekom trenutku bili izloženi ovim široko rasprostranjenim MGE-ovima ili bakterijama koje ih nose te su razvili imunosnu memoriju protiv njih. Globalna distribucija ovih dviju razmaknica dodatno potvrđuje da se radi o sekvencama koje su značajne na međukontinentalnoj razini. To implicira da su MGE-ovi koji nose ove sekvence, ili bakterijski sojevi koji ih sadrže, globalno rasprostranjeni (moguće i poliklonalno) i da sustavi CRISPR-Cas u različitim geografskim područjima neovisno stječu razmaknice protiv njih. Osim ove dvije razmaknice, i mnoge druge razmaknice svih triju lokusa su pronađene u geografski

udaljenim izolatima *K. pneumoniae*, kao i u drugim vrstama enterobakterija što naglašava potrebu za praćenjem ovog sustava i njegovog utjecaja na pojavu višestruke otpornosti (Kannadasan i sur., 2023.). Postavlja se pitanje funkcionalnog značaja ovih sekvenci na fagima i plazmidima. Moguće je da se radi o esencijalnim regijama za replikaciju, prijenos ili virulenciju tih pokretnih elemenata, što ih čini dobrim kandidatima za ciljanje od strane sustava CRISPR-Cas. Činjenica da se ove razmaknice nalaze i na kromosomima raznih sojeva *K. pneumoniae*, i drugih enterobakterija, može ukazivati na:

- 1) Integrirane pokretne elemente: Moguće je da su dijelovi faga ili plazmida koji sadrže ove sekvence integrirani u kromosome tih bakterija (kao profagi ili druge integrirane regije), a sustav CRISPR-Cas je stekao razmaknice protiv tih integriranih elemenata.
- 2) Dijeljene homologne regije: Alternativno, ove sekvence mogu predstavljati homologne regije koje su evolucijski očuvane ili horizontalno prenesene i integrirane neovisno o cjelovitim MGE-ovima, a koje su kasnije postale mete lokusa CRISPR.

Iako stjecanje razmaknice ukazuje na aktivnu obranu, pojavnost ovih sekvenci u bakterijskim kromosomima, fagima i plazmidima sugerira da sustav CRISPR-Cas možda nije uspješan u eliminaciji svih elemenata koji nose protorazmaknice. Već je spomenuto i da plazmidi IncFII koji nose *bla*_{KPC-2} mogu koegzistirati sa sustavima CRISPR-Cas podtipa I-E* kod soja ST15 *K. pneumoniae* unatoč tome što neke od tih razmaknice u lokusu podtipa I-E* ciljaju te plazmide, ukazujući na smanjenu učinkovitost ili potpunu neaktivnost sustava CRISPR-Cas u određenim situacijama (Hu i sur., 2023.). Stoga se može reći da ovakve "višestruke" zajedničke razmaknice mogu služiti kao markeri za praćenje protoka specifičnih, pokretnih genetskih informacija kroz bakterijske populacije i ekosustave.

Naši rezultati sugeriraju različitu dinamiku i aktivnost analiziranih lokusa CRISPR. Naime, lokus CRISPR1 pokazao je čestu pojavu istih razmaknica među različitim izolatima, dok su svi izolati CRKp imali identične razmaknice u ovom lokusu, što bi moglo ukazivati na klonalno širenje izolata ili na utjecaj istog selektivnog pritiska. Slično, lokus CRISPR2 bio je visoko konzerviran, ali je pokazivao različite obrasce: jedan set razmaknica bio je specifičan za sojeve CRKp, dok je drugi bio prisutan kod sojeva CSKp. Izuzetak su bila tri izolata CSKp koja su dijelila proksimalne razmaknice s izolatima CRKp i imali "nove" distalne razmaknice, što ukazuje na moguće događaje HGT-a ili nedavne adaptacije. Slično se uočilo s lokusom CRISPR3. Dvije proksimalne razmaknice lokusa CRISPR3 su bile široko rasprostranjene među izolatima CSKp i CRKp različitih grupa ST što ukazuje na potencijalno aktivan sustav u

stjecanju novih razmaknica. S druge strane, visoko konzervirani profili lokusa CRISPR3 unutar dominantnih CRKp grupa ST (ST14, ST15, ST101) upućuju na to da se ovi sustavi vjerojatno nasljeđuju klonalno, uz ograničeno stjecanje novih razmaknica. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razlučilo koji je odgovorni mehanizam u stjecanju razmaknica. Aktivnost sustava CRISPR-Cas mogla bi se dokazati određivanjem ekspresije gena *cas1* ili *cas3* pomoću metode kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu.

Slično našim rezultatima, Shen i sur. su kod sojeva *K. pneumoniae* primijetili varijacije između lokusa CRISPR2 i 3 istog podtipa I-E*. Specifično, lokus CRISPR3 je bio aktivniji od lokusa CRISPR2, uzimajući u obzir stjecanje novih razmaknica koje su detektirane u lokusu CRISPR3, dok je u lokusu CRISPR2 uočena delecija razmaknica unutar određenih grupa ST (Shen i sur., 2017.). Različita aktivnost lokusa CRISPR2 i 3 možda je posljedica različitih vodećih sekvenci. Vodeća sekvenca lokusa CRISPR2 kod roda *Klebsiella* ima relativno nizak AT sadržaj, dok druge vodeće sekvence imaju visok AT sadržaj, što je važno jer vodeća sekvenca funkcionira kao promotor i mjesto za umetanje novih razmaknica (Shen i sur., 2017.). Osim toga, Shen i sur. su uočili korelaciju između lokusa CRISPR i grupa ST, gdje su svi sojevi s identičnim lokusima CRISPR pripadali istoj grupi ST, pri čemu nemaju svi pripadnici iste grupe ST iste lokuse CRISPR (Shen i sur., 2017.). Mi smo definirali dva "klonalna kompleksa" temeljena na razmaknicama lokusa CRISPR. Prvi klonalni kompleks obuhvaća sojeve CRKp grupe ST14, ST15 i ST101 (Slika 23.), a drugi sojeve CSKp grupe ST35 (Slika 25.). Stoga naši rezultati potvrđuju drugu hipotezu prema kojoj su sekvence lokusa CRISPR različite u izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme. Osim toga, razmaknice svih sojeva CRKp su visoko konzervirane i vezane uz specifičnu grupu ST. Ovo je u skladu sa istraživanjima gdje su genomi sojeva koji sadrže iste razmaknice lokuse CRISPR uglavnom koncentrirani u grupe ST147, ST14, ST15 te posebno u hipervirulentnu klonalnu grupu ST23 koja značajno uzrokuje infekcije povezane s otpornošću na karbapeneme (Alkompoza i sur., 2023.; Hu i sur., 2023.). Također, ovi rezultati potvrđuju treću hipotezu prema kojoj kod izolata bakterije *K. pneumoniae* postoji povezanost između pripadnosti pojedinim grupama ST i sastava lokusa CRISPR.

CRISPR-Cas negativni izolati bili su češće izolirani iz uzorka stolice pacijenata hospitaliziranih na pedijatrijskom JIL-u u usporedbi s CRISPR-Cas pozitivnim izolatima (Tablica 11., Tablica 12.). Vjerojatno su sojevi *K. pneumoniae* nađeni kod novorođenčadi bili izloženi manjem selektivnom pritisku stranih genetskih elemenata, poput plazmida i bakteriofaga, u usporedbi sa sojevima izoliranim iz odraslih pacijenata. Ova varijacija u

prisustvu sustava CRISPR-Cas sugerira da je sustav CRISPR-Cas povezan i sa specifičnim kliničkim okruženjima i populacijama pacijenata, zbog čega su odrasli pacijenti "prikladnija" ciljna skupina za ova istraživanja. Izolati kod kojih je pronađen sustav CRISPR-Cas bili su značajno učestaliji među pacijentima primljenima na COVID-19 odjele i COVID-19 JIL (Tablica 11.). Razlog tome je vjerojatno taj što su pacijenti, kod kojih je detektiran SARS-CoV-2, s raznih drugih odjela bili smješteni na iste COVID-19 odjele i JIL-ove, pa je kod takvih sojeva moglo lakše doći do klonalnog širenja. Sukladno tome, primijećena je i povezanost godine uzimanja uzorka, prisutnosti sustava CRISPR-Cas, vrste karbapenemaze te pripadnosti grupi ST15 (Slika 20.). Stoga se može reći da su se CRISPR-Cas pozitivni izolati ST15 *K. pneumoniae*, koji proizvode NDM-1, vrlo vjerojatno monoklonski proširili među pacijentima na COVID-19 odjelima i JIL-ovima. Međutim, primijećeno je i suprotno, izolati CSKp grupe ST35 su imali varijabilne lokuse CRISPR3 (Slika 24.) što sugerira da ovi sojevi nisu monoklonski rasprostranjeni, ali postoji mogućnost da su potekli od iste bakterije pretka što pokazuju slični ili isti lokusi CRISPR1 i 2 sojeva CSKp grupe ST35 s istih i različitih odjela (Slika 25.). Otežana korelacija CRISPR-Cas pozitivnih izolata s bolničkim odjelima može biti zbog malog broja sekvenciranih lokusa CRISPR izolata kod kojih je pronađen sustav CRISPR-Cas i različitih godina prikupljanja uzoraka. Sumirano, ovi rezultati potvrđuju četvrtu hipotezu prema kojoj se prisutnost sustava CRISPR-Cas razlikuje ovisno o kliničkim karakteristikama bolesnika i vrsti uzorka iz kojeg izolat *K. pneumoniae* potječe jer su dvije kliničke karakteristike (hipertenzija i dijabetes) statistički značajno češće kod CRISPR-Cas pozitivnih izolata nego kod izolata koji nisu imali ovaj imunosni sustav (Slika 16. i Tablica 11.). Što se tiče vrste uzorka, treba imati na umu da visoka zastupljenost CRISPR-Cas negativnih sojeva, najčešće izoliranih iz uzoraka stolice, uzetih na pedijatrijskom JIL-u (Tablica 11., Slika 17., Tablica 12.), nije nužno odraz specifične dinamike unutar te bolničke jedinice, već je vjerojatnije posljedica bioloških karakteristika dominantno zastupljene neonatalne populacije od koje potječe više od trećine uzoraka stolice, kako je u tekstu iznad već objašnjeno.

Izuzev malog broja sekvenciranih lokusa CRISPR i različitih godina prikupljanja uzoraka, na funkcionalnost, aktivnost i učinkovitost sustava CRISPR-Cas može utjecati mnoštvo čimbenika koji mogu dovesti do ovako varijabilnih rezultata (posebno istovremene pojavnosti sustava CRISPR-Cas i gena koji kodiraju za karbapenemaze):

- 1) Mutacije i gubitak funkcionalnosti CRISPR-Cas sustava

Točkaste mutacije, kao i veće genetske promjene poput insercija ili delecija unutar *cas* gena, mogu onemogućiti stjecanje novih razmaknica. Tako su primjerice mutacije posredovane insercijskim sekvencama u genima *cas1* i *cas2* korelirale sa širenjem sojeva MDR kod vrsta roda *Shigella* (Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Osim toga, kod izolata *K. pneumoniae* je zabilježeno da protein Cas1 može biti odsutan, što onemogućuje formiranje kompleksa Cas1-Cas2 koji igra ključnu ulogu u stjecanju novih razmaknica (Li i sur., 2018.; Killelea i sur., 2023.).

2) Regulacija ekspresije i aktivnosti sustava CRISPR-Cas

Aktivnost sustava CRISPR-Cas nije uvijek konstantna, već može biti podložna složenoj genetskoj regulaciji. Primjer je već spomenuti protein H-NS za kojeg je dokazano da potiskuje sustav CRISPR-Cas kod sojeva *K. pneumoniae* i *E. coli* izravnim vezanjem na promotor operona *cas* (Lin i sur., 2016.).

3) Anti-CRISPR (Acr) proteini i samociljajuće razmaknice (autoimunost)

Jedan od najznačajnijih načina na koje MGE-ovi izbjegavaju CRISPR-Cas obranu jest putem proteina Acr koje kodiraju fagi i plazmidi (Liao i sur., 2020.; Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Prisutnost proteina Acr se objašnjava tako da sojevi *K. pneumoniae* pomoću njih uspijevaju zadržati plazmide koji nose gene otpornosti, čak i kada ti plazmidi sadrže protorazmaknice koje bi sustav CRISPR-Cas domaćina trebao prepoznati i ciljati. Inaktivacija ovog sustava fagom koji kodira anti-CRISPR proteine mogla bi biti jedno od objašnjenja za postojanje samociljajućih razmaknica (Shen i sur., 2017.) koje teoretski mogu dovesti do autoimunog odgovora, odnosno inaktivacije sustava CRISPR-Cas (Ostria-Hernández i sur., 2015.; Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Međutim, pronađeno je da se kod sojeva *K. pneumoniae* može tolerirati visoka učestalost komplementarnih samociljajućih razmaknica bez dokaza o mutacijama u sekvencama PAM ili vodećim sekvencama koje bi umanjile njihovu aktivnost (Shen i sur., 2017.). Ovo sugerira da bakterije mogu imati mehanizme za razlikovanje "korisnih" integriranih elemenata od invazivnih ili da samociljajuće razmaknice mogu imati alternativne uloge u regulaciji gena, a ne isključivo u imunskoj obrani (Shen i sur., 2017.). Mogućnost je i da ugradnja razmaknica sličnih vlastitom genomu može biti posljedica pogrešaka proteina Cas (Ostria-Hernández i sur., 2015.).

4) Mutacije u protorazmaknicama i regijama PAM

Promjene poput točkastih mutacija unutar protorazmaknice ili sekvence PAM mogu značajno smanjiti sposobnost sustava CRISPR-Cas da posreduje u cijepanju strane DNA i/ili RNA (Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Dodatno, karakteristike same razmaknice, poput njenog GC sadržaja i blizine vodećoj sekvenci (eng. *leader sequence*), mogu utjecati na učinkovitost sustava (Kadkhoda i sur., 2024.).

5) Snažan selektivni pritisak i adaptivni trošak održavanja sustava

U okruženjima gdje postoji konstantan selektivni pritisak, koji favorizira brzo stjecanje gena otpornosti u bolničkim uvjetima, održavanje funkcionalnog sustava CRISPR-Cas može predstavljati adaptivni trošak (Liao i sur., 2020.; Alkompoz i sur., 2023.; Kadkhoda i sur., 2024.). Ako sustav sprječava stjecanje korisnih gena (npr. onih koji omogućuju preživljavanje u prisutnosti antibiotika), bakterije koje izgube ili imaju oslabljen sustav CRISPR-Cas mogu imati selektivnu prednost (Pursey i sur., 2022.). To potencijalno može dovesti do postepenog gubitka cijelog sustava ili njegovih ključnih dijelova.

Iako je primarna funkcija sustava CRISPR-Cas u prokariota obrambeni mehanizam protiv invazivnih genetičkih elemenata, njihova preciznost i specifičnost u ciljanju DNA i/ili RNA molekula učinile su ih revolucionarnim alatom u biotehnologiji, uključujući uređivanje genoma i razvoj novih antimikrobnih strategija (Wang i sur., 2018; Sun i sur., 2019.). Tako je tehnologija CRISPR-Cas9 već uspješno primijenjena kao alat za uređivanje genoma i razvoj novih pristupa u borbi protiv višestruko otpornih bakterija, uključujući i *K. pneumoniae* (Wang i sur., 2018.; Sun i sur., 2019.). Jedan od obećavajućih pristupa je korištenje sustava CRISPR-Cas za specifično ciljanje i uklanjanje gena otpornosti na plazmidima ili u kromosomu bakterija. Na primjer, Wang i sur. su razvili učinkovit sustav CRISPR-Cas9 s dva plazmida (pCasKP-pSGKP) za precizno uređivanje genoma bakterije *K. pneumoniae*. Primjenom ovog sustava uspješno je deletiran gen *bla_{KPC-2}*, koji se i u našoj studiji pokazao "najproblematičnijim" jer su sojevi koji su nosili ovaj gen bili otporni na sva tri testirana karbapenema (Wang i sur., 2018.).

Slično tome, Sun i sur. su primijenili tehnologiju CRISPR-Cas9 te uređivanjem genoma uspješno inaktivirali gene poput *tetA*, *ramR* i *mgrB* koji su povezani s otpornošću na tigeceklin i kolistin. Inaktivacija gena *mgrB* rezultirala je značajnim smanjenjem otpornosti na kolistin,

dok je inaktivacija gena *tetA* ili *ramR* utjecala na osjetljivost na tigećiklin (Sun i sur., 2019.). Ovi rezultati potvrđuju da se CRISPR-Cas9 može učinkovito koristiti za funkcionalnu karakterizaciju gena otpornosti i manipulaciju genotipa bakterija kako bi se ponovo uspostavila osjetljivost bakterijske stanice na antimikrobne lijekove. S obzirom na prethodno navedene prepreke, koje su razlog smanjene aktivnosti ili nefunkcionalnosti endogenog sustava CRISPR-Cas, buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na optimizaciju dostave ovog sustava u bakterijsku stanicu, razvoj pametnih strategija za izbjegavanje mehanizama anti-CRISPR te kombiniranje terapije CRISPR-Cas s drugim antimikrobnim agensima. Razumijevanje dinamike endogenih sustava CRISPR-Cas moglo bi dodatno doprinijeti dizajnu učinkovitijih, ciljanih antimikrobnih strategija.

Koliko nam je poznato, ovo je prvo istraživanje u Hrvatskoj koje opisuje učestalost i karakteristike sustava CRISPR-Cas kod kliničkih izolata *K. pneumoniae*. Naša analiza ukazuje na postojanje dvaju podtipova sustava CRISPR-Cas tipa I u sojeva *K. pneumoniae* koji se razlikuju prema građi i varijabilnosti sekvenci razmaknica. Iako se čini da sustavi CRISPR-Cas tipa I-E i I-E* ograničavaju stjecanje određenih gena za karbapenemaze, poput *bla_{OXA-48}*, čini se da oba tipa istodobno mogu koegzistirati s genima *bla_{NDM-1}* i *bla_{KPC-2}*. Nadalje, uočene razlike u mogućoj aktivnosti lokusa CRISPR između izolata CRKp i CSKp, kao i korelacija sadržaja razmaknica s klonalnim širenjem, naglašavaju mogući potencijal analize razmaknica lokusa CRISPR kao komplementarnog alata za subtipizaciju izolata uz PFGE i MLST. Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na istraživanje aktivnosti različitih lokusa CRISPR, uključujući detaljnu analizu svih razmaknica i ekspresiju gena *cas*. Daljnje studije koje kombiniraju analizu lokusa CRISPR s potpunim sekvenciranjem bakterijskog genoma omogućit će bolje razumijevanje interakcije između sustava CRISPR-Cas i MGE-ova koji nose gene otpornosti i virulencije. Također, istraživanje prevalencije proteina Acr u lokalnim izolatima *K. pneumoniae* moglo bi pomoći u objašnjenju slučajeva gdje sustavi CRISPR-Cas ne uspijevaju spriječiti stjecanje novih plazmida čije protorazmaknice su ugradili kao razmaknice. Razumijevanje ovih kompleksnih interakcija ključno je za procjenu potencijala sustava CRISPR-Cas kao dijagnostičkog ili terapijskog alata u borbi protiv infekcija uzrokovanih MDR sojevima *K. pneumoniae*.

6. ZAKLJUČAK

1. Sustav CRISPR-Cas tipa I nije široko rasprostranjen u kliničkim sojevima *K. pneumoniae* izoliranim iz uzoraka bolesnika Kliničkog bolničkog centra Zagreb, s ukupnom učestalosti od 15.8 % (63/400) utvrđenom na temelju prisutnosti gena *cas1*.
2. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti sustava CRISPR-Cas između izolata *K. pneumoniae* osjetljivih i otpornih na karbapeneme.
3. U analiziranim izolatima *K. pneumoniae* detektirana su oba poznata podtipa CRISPR-Cas sustava tipa I: podtip I-E (definiran prisutnošću lokusa CRISPR1) i podtip I-E* (definiran prisutnošću lokusa CRISPR2 i/ili CRISPR3). Većina CRISPR-Cas pozitivnih izolata posjedovala je oba navedena podtipa. Ipak, lokus CRISPR3 je bio statistički značajno češće prisutan kod sojeva CRKp, dok se učestalost CRISPR1 i CRISPR2 lokusa nije značajno razlikovala između izolata CRKp i CSKp.
4. CRISPR-Cas pozitivni i negativni izolati *K. pneumoniae* nisu se razlikovali s obzirom na stopu otpornosti na antimikrobne lijekove osim kod kombinacije imipenem + relebaktam za koju je stopa otpornosti kod CRISPR-Cas pozitivnih izolata bila statistički značajno niža u usporedbi s CRISPR-Cas negativnim izolatima.
5. Postoji povezanost između prisutnosti određenih gena *bla* koji kodiraju za karbapenemaze i prisutnosti sustava CRISPR-Cas. Učestalost gena *bla*_{OXA-48} bila je statistički značajno veća kod CRISPR-Cas negativnih sojeva, dok su geni *bla*_{NDM-1} i *bla*_{KPC-2} bili statistički značajno češći kod CRISPR-Cas pozitivnih izolata.
6. Na temelju analize razmaknica lokusa CRISPR, moguće je definirati dva uvjetna "klonalna kompleksa": jedan koji obuhvaća sojeve CRKp grupa ST14, ST15 i ST101 te drugi koji uključuje sojeve CSKp dominantne grupe ST35. Ipak, uočeno je i dijeljenje pojedinih razmaknica između nekih izolata CRKp i CSKp, što ukazuje na složenu dinamiku i mogući horizontalni prijenos lokusa CRISPR.
7. Analiza sekvenci razmaknica lokusa CRISPR u izolatima CRKp ukazuje na visoku konzerviranost razmaknica i snažnu korelaciju s pripadnošću dominantnim grupama ST (ST14, ST15, ST101) unutar određenog vremenskog perioda uzorkovanja, sugerirajući monoklonsko ili poliklonsko širenje ovih sojeva CRKp. Nasuprot tome, izolati CSKp su pokazali znatno veću raznolikost razmaknica i grupa ST.
8. Analiza podrijetla razmaknica triju lokusa CRISPR pokazala je da je većina razmaknica homologna s poznatim sekvencama, pri čemu je najveća podudarnost bila s kromosomskim regijama *K. pneumoniae*. Značajan udio razmaknica također je pokazao homologiju s plazmidima, drugim bakterijskim vrstama i bakteriofagima. Identificirano je i 17 nehomolognih/nepoznatih razmaknica.

9. Uočena je različita dinamika između tri analizirana lokusa CRISPR, pri čemu je lokus CRISPR3 pokazivao najveću raznolikost i varijabilnost razmaknica, dok su lokusi CRISPR1 i CRISPR2 bili konzervirani.
10. Analizom kliničkih karakteristika bolesnika utvrđeno je da su hipertenzija i dijabetes statistički značajno češće prisutni kod bolesnika s CRISPR-Cas pozitivnim izolatima u usporedbi s bolesnicima s CRISPR-Cas negativnim izolatima.
11. Izolati *K. pneumoniae* sa sustavom CRISPR-Cas bili su statistički značajno češći kod bolesnika hospitaliziranih u jedinicama intenzivnog liječenja COVID-19, pri čemu su ti izolati dominantno pripadali grupi ST15 i nosili gen *bla*_{NDM-1}, ukazujući na moguće monoklonsko širenje specifične linije sojeva CRKp kod kojih je detektiran sustav CRISPR-Cas.
12. CRISPR-Cas negativni izolati bili su statistički značajno češće prisutni kod bolesnika u pedijatrijskim jedinicama intenzivnog liječenja, a kako veliki broj uzoraka stolice potječe upravo od novorođenčadi, uzorak stolice je bio statistički značajno češći uzorak kod bolesnika s CRISPR-Cas negativnim izolatima.
13. Hipermukoviskozni (HMV) fenotip utvrđen je kod malog broja CRISPR-Cas pozitivnih izolata pri čemu se izolati CRKp i CSKp nisu statistički značajno razlikovali.
14. Ova studija pruža prvi uvid u dinamiku i karakteristike sustava CRISPR-Cas u kliničkoj populaciji izolata *K. pneumoniae* u Hrvatskoj te ističe potencijal analize razmaknica CRISPR kao komplementarnog alata za subtipizaciju i molekularno-epidemiološka istraživanja.

7. POPIS LITERATURE

Abbas R, Chakkour M, Zein El Dine H, Obaseki EF, Obeid ST, Jezzini A, i sur. General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology (Basel)*. 2024;13(2):78. doi: 10.3390/biology13020078.

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677-8. doi: 10.1093/clinids/10.4.677.

Acman M, Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Wang Q, Luhmann N, i sur. Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene *bla_{NDM}*. *Nat Commun*. 2022;13(1):1131. doi: 10.1038/s41467-022-28819-2.

Alkompoz AK, Hamed SM, Zaid ASA, Almangour TA, Al-Agamy MH, Aboshanab KM. Correlation of CRISPR/Cas and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microorganisms*. 2023;11(8):1948. doi: 10.3390/microorganisms11081948.

Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, i sur. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4443-51. doi: 10.1128/AAC.00099-14.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321–31. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.

Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, i sur. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 1991;276 (Pt 1):269–70. doi: 10.1042/bj2760269.

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014;513(7519):569-73. doi: 10.1038/nature13579.

Backes N, Phillips GJ. Repurposing CRISPR-Cas Systems as Genetic Tools for the Enterobacteriales. *EcoSal Plus*. 2021;9(2):eESP00062020. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2020.

Bakthavatchalam YD, Jennifer L, Abdullah F, Srinivasan D, Adhiya R, Ashok A i sur. Current trend of biapenem susceptibility and disc diffusion breakpoints in Enterobacterales and

Pseudomonas aeruginosa. *Indian J Med Microbiol*. 2024;51:100695. doi: 10.1016/j.ijmmb.2024.100695.

Barišić M. Karakterizacija karbapenemaza u enterobakterija [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2012. [pristupljeno 07.02.2025.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:332055>.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, i sur. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709–12. doi:10.1126/science.1138140.

Bedenić B. Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović-Kamberović S, ur. Medicinska mikrobiologija. Zenica: Štamparija Fojnica; 2009. str. 221-251.

Bedenić B, Luxner J, Zarfel G, Benčić A, Sardelić S, Anušić M i sur. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Resistant to Cefiderocol from Hospitals and Outpatient Settings in Croatia. *Antibiotics (Basel)*. 2025 Feb 4;14(2):154. doi: 10.3390/antibiotics14020154.

Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, Bošnjak Z, Barl P, Vraneš J, i sur. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother*. 2012;24(4):237-9. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000017.

Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, i sur. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol*. 2018;67(8):1031-1041. doi: 10.1099/jmm.0.000777.

Berger S, Alauzet C, Aissa N, Hénard S, Rabaud C, Bonnet R i sur. Characterization of a new *bla*_{OXA-48}-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):4064-7. doi: 10.1128/AAC.02550-12.

Biez L, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. Characterization of VIM-1-, NDM-1- and OXA-48-producing *Citrobacter freundii* in France. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(4):1200-2. doi: 10.1093/jac/dkac005.

Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, i sur. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1146-50. doi: 10.1038/nbt.3043.

Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(15):7429-37. doi: 10.1093/nar/gkt520.

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151(Pt 8):2551–61. doi:10.1099/mic.0.28048-0.

Bošnjak Z, Hasman H, Hansen F, Hammerum AM, Roer L, Jurić I, i sur. Co-occurrence of triple carbapenemase genes, *bla_{VIM-2}*, *bla_{NDM-1}*, and *bla_{OXA-48}* in *Enterobacter hormaechei* clinical isolates – first report from Croatia. *J Chemother.* 2025;37(1):10-14. doi: 10.1080/1120009X.2024.2354107.

Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(8):e0021622. doi: 10.1128/aac.00216-22.

Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L i sur. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 2009;4(3):e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982.

Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(Pt 3):915–24. doi: 10.1099/00207713-51-3-915.

Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, i sur. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960–4. doi:10.1126/science.1159689.

Bui T, Patel P, Preuss CV. Cephalosporins. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. [pristupljeno 17. veljače 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>.

Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e01076-18. doi: 10.1128/AAC.01076-18.

Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8):a025247. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211–33. doi: 10.1128/AAC.39.6.1211.

Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms*. 2023;11(6):1491. doi: 10.3390/microorganisms11061491.

Canton R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(4):315–25.

Car H, Dobrić M, Pospišil M, Nađ M, Luxner J, Zarfel G i sur. Comparison of Carbapenemases and Extended-Spectrum β -Lactamases and Resistance Phenotypes in Hospital- and Community-Acquired Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Croatia. *Microorganisms*. 2024 Nov 2;12(11):2224. doi: 10.3390/microorganisms12112224.

Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6–7):298–304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. [pristupljeno 16.07.2025.] Dostupno na: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/index.html>.

Ceylan AN, Kömeç S, Şanlı K, Öncel B, Durmuş MA, Gülmez A. Are New β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations Promising Against Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Isolates? *Pathogens*. 2025;14(3):220. doi: 10.3390/pathogens14030220.

Chang CY, Ong ELC. Positive string test in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. *Oxf Med Case Reports*. 2022;(4):omac035. doi: 10.1093/omcr/omac035.

Chatzidimitriou M, Kavvada A, Kavvadas D, Kyriazidi MA, Eleftheriadis K, Varlamis S i sur. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Balkans: Clonal distribution and associated resistance determinants. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2024;71(1):10-24. doi: 10.1556/030.2024.02230.

Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G, i sur. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell.* 2013;155(7):1479–91. doi:10.1016/j.cell.2013.12.001.

Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *J Intern Med.* 2020;287(3):283–300. doi:10.1111/joim.13007.

Cho JC, Fiorenza MA, Estrada SJ. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy.* 2015;35(7):701–15. doi: 10.1002/phar.1609.

Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel).* 2017;6(1):1. doi: 10.3390/medsci6010001.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, i sur. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819–23. doi:10.1126/science.1231143.

Coppola N, Maraolo AE, Onorato L, Scotto R, Calò F, Atripaldi L, i sur. Epidemiology, Mechanisms of Resistance and Treatment Algorithm for Infections Due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: An Expert Panel Opinion. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(9):1263. doi: 10.3390/antibiotics11091263.

Cotroneo N, Rubio A, Critchley IA, Pillar C, Pucci MJ. *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of Tebipenem, an Oral Carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(8):e02240-19. doi: 10.1128/AAC.02240-19.

Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: detection and antimicrobial therapy. *Front Microbiol.* 2019;10:1823. doi: 10.3389/fmicb.2019.01823.

David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S i sur. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019;4(11):1919-1929. doi: 10.1038/s41564-019-0492-8.

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-82. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.

Dong N, Yang X, Chan EW, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine.* 2022;79:103998. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103998.

Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36 Suppl A:1-17. doi: 10.1093/jac/36.suppl_a.1.

El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-195. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.022.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Verzija 14.0.; 2024. [pristupljeno 28.05.2025.] Dostupno na: <http://www.eucast.org>.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929;10(3):226–36.

Friedlaender C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1882;87:319–24. doi: 10.1007/BF01880516.

Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio.* 2014;5(1):e00928-13. doi: 10.1128/mBio.00928-13.

Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Cantón R, Rossolini GM, Campos J, i sur. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 2010;15(46):19711. doi: 10.2807/ese.15.46.19711-en.

Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, Echols R, Karlowsky JA, Sahm DF. *In Vitro* Activity of the Siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against Carbapenem-Nonsusceptible and Multidrug-Resistant Isolates of Gram-Negative Bacilli Collected Worldwide in 2014 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):e01968-17. doi: 10.1128/AAC.01968-17.

Hagiya H, Watanabe N, Maki M, Murase T, Otsuka F. Clinical utility of string test as a screening method for hypermucoviscosity-phenotype *Klebsiella pneumoniae*. *Acute Med Surg*. 2014;1(4):245-246. doi: 10.1002/ams2.40.

Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K i sur. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(7):2720-31. doi: 10.3390/ijerph10072720.

Hermans PWM, Van Soolingen D, Bik EM, De Haas PEW, Dale JW, Van Embden JDA. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun*. 1991;59(8):2695–705.

Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018;172(6):1239-1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.

Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, i sur. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):E3574–81. doi: 10.1073/pnas.1501049112.

Hu Y, Jiang J, Wang D, Guo Q, Wang M. Coexistence of *bla*_{KPC}-IncFII plasmids and type I-E* CRISPR-Cas systems in ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2023;14:1125531. doi: 10.3389/fmicb.2023.1125531.

Huang C, Chen I, Yang Y. Doripenem in the Treatment of Patients with Nosocomial Pneumonia: A Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2022;11(14):4014. doi: 10.3390/jcm11144014.

Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51:72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):303-15. doi: 10.1016/j.cll.2017.01.005.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and

identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429–33. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, Yoshizawa H, Sato T, Nakamura R i sur. Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7396-7401. doi: 10.1128/AAC.01405-16.

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82. doi: 10.1128/CMR.00036-08.

Jang S. AcrAB-TolC, a major efflux pump in Gram negative bacteria: toward understanding its operation mechanism. *BMB Rep.* 2023;56(6):326-34. doi: 10.5483/BMBRep.2023-0070.

Jansen R, van Embden JDA, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–75. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.

Jaurin B, Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(8):4897–901. doi: 10.1073/pnas.78.8.4897.

Jelić M. Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2018. [pristupljeno 07.02.2025.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:737644>.

Jelić M, Škrlin J, Bejuk D, Koščak I, Butić I, Gužvinec M, i sur. Characterization of isolates associated with emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *Microb Drug Resist.* 2018;24(7):973-9. doi: 10.1089/mdr.2017.0168.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–21. doi:10.1126/science.1225829.

Jwair NA, Al-Ouqaili MTS, Al-Marzooq F. Inverse association between the existence of CRISPR/Cas systems with antibiotic resistance, extended spectrum β -lactamase and

carbapenemase production in multidrug, extensive drug and pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(6):980. doi: 10.3390/antibiotics12060980.

Kadkhoda H, Gholizadeh P, Ghotaslou R, Nabizadeh E, Pirzadeh T, Ahangarzadeh Rezaee M i sur. Role of CRISPR-cas system on virulence traits and carbapenem resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Pathog*. 2025;199:107151. doi: 10.1016/j.micpath.2024.107151.

Kadkhoda H, Gholizadeh P, Ghotaslou R, Pirzadeh T, Ahangarzadeh Rezaee M, Nabizadeh E, i sur. Prevalence of the CRISPR-cas system and its association with antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *BMC Infect Dis*. 2024;24(1):554. doi: 10.1186/s12879-024-09451-5.

Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, i sur. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1979;32(1):1-12. doi: 10.7164/antibiotics.32.1.

Kamruzzaman M, Iredell JR. CRISPR-Cas system in antibiotic resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2020;10:2934. doi: 10.3389/fmicb.2019.02934.

Kannadasan AB, Sumantran VN, Vaidyanathan R. A Global Comprehensive Study of the Distribution of Type I-E and Type I-E* CRISPR-Cas Systems in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Community Med*. 2023;48(4):567-572. doi: 10.4103/ijcm.ijcm_486_22.

Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):234. doi: 10.3390/antibiotics12020234.

Killelea T, Dimude JU, He L, Stewart AL, Kemm FE, Radovčić M i sur. Cas1-Cas2 physically and functionally interacts with DnaK to modulate CRISPR Adaptation. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(13):6914-6926. doi: 10.1093/nar/gkad473.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y i sur. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3365-70. doi: 10.1128/AAC.00126-09.

Kocsis E, Gužvinac M, Butić I, Krešić S, Crnek SŠ, Tambić A i sur. *bla*_{NDM-1} Carriage on IncR Plasmid in *Enterobacteriaceae* Strains. *Microb Drug Resist.* 2016;22(2):123-8. doi: 10.1089/mdr.2015.0083.

Koonin EV, Krupovic M. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):184-92. doi: 10.1038/nrg3859.

Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67-78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

Kuzina ES, Kislichkina AA, Sizova AA, Skryabin YP, Novikova TS, Ershova ON, i sur. High-molecular-weight plasmids carrying carbapenemase genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{OXA-48} coexisting in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains of ST39. *Microorganisms.* 2023;11(2):459. doi: 10.3390/microorganisms11020459.

Li HY, Kao CY, Lin WH, Zheng PX, Yan JJ, Wang MC, i sur. Characterization of CRISPR-Cas systems in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates uncovers its potential association with antibiotic susceptibility. *Front Microbiol.* 2018;9:1595. doi: 10.3389/fmicb.2018.01595.

Li J, Gao Q, Ma Y, Deng Y, Li S, Shi N i sur. Causality of Opportunistic Pathogen *Klebsiella pneumoniae* to Hypertension Development. *Hypertension.* 2022;79(12):2743-2754. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19602.

Li X, Wang L, Lin J, Gu Y, Liu Z, Hu J. Detection of CRISPR-Cas and type I R-M systems in *Klebsiella pneumoniae* of human and animal origins and their relationship to antibiotic resistance and virulence. *Microbiol Spectr.* 2025;13(2):e00009-24. doi: 10.1128/spectrum.00009-24.

Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016;7:1374. doi: 10.3389/fmicb.2016.01374.

Liao W, Liu Y, Chen C, Li J, Du F, Long D, i sur. Distribution of CRISPR-Cas systems in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Microb Drug Resist.* 2020;26(6):630-636. doi: 10.1089/mdr.2019.0276.

Lin TL, Pan YJ, Hsieh PF, Hsu CR, Wu MC, Wang JT. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*. 2016;6:31644. doi: 10.1038/srep31644.

Lin X, Kück U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(24):8007-8020. doi: 10.1007/s00253-022-12272-8.

Lin XC, Li CL, Zhang SY, Yang XF, Jiang M. The Global and Regional Prevalence of Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2023;11(2):ofad649. doi: 10.1093/ofid/ofad649.

Lister PD. Carbapenems in the USA: focus on doripenem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(5):793-809. doi: 10.1586/14787210.5.5.793.

Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012;27(2):128-42. doi: 10.3904/kjim.2012.27.2.128.

Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(suppl_1):S28-S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282.

Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, i sur. Whole-genome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*. 2017a;2(4):e00290–17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00290-17.

Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, i sur. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. *mBio*. 2017b;8(3):e00489–17. doi: 10.1128/mBio.00489-17.

López Montesinos I, Montero M, Sorlí L, Horcajada JP. Ceftolozane-tazobactam: When, how and why using it? *Rev Esp Quimioter*. 2021;34(Suppl 1):35-37. doi: 10.37201/req/s01.10.2021.

Mackow NA, Shen J, Adnan M, Khan AS, Fries BC, Diago-Navarro E. CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225131. doi: 10.1371/journal.pone.0225131.

Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, i sur. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–208. doi: 10.1056/NEJMoa1306801.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, i sur. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Majdandžić I, Mareković I, Budimir A. In vitro susceptibility of aztreonam/avibactam against metallo- β -Lactamase-producing Enterobacterales in a Croatian tertiary care hospital. *Infect Dis Now*. 2025;55(5):105092. doi: 10.1016/j.idnow.2025.105092.

Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct*. 2011;6:38. doi: 10.1186/1745-6150-6-38.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, i sur. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722–36. doi:10.1038/nrmicro3569.

Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, i sur. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67–83. doi:10.1038/s41579-019-0299-x.

Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(6):1392–400. doi: 10.1042/BST20130038.

Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *CRISPR J*. 2018;1(5):325–336. doi: 10.1089/crispr.2018.0033.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, i sur. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823–6. doi:10.1126/science.1232033.

Mansilla MC, Albanesi D, de Mendoza D. Transcriptional control of the sulfur-regulated *cysH* operon, containing genes involved in L-cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2000;182(20):5885–92. doi: 10.1128/JB.182.20.5885-5892.2000.

Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*. 2008;322(5909):1843–5. doi:10.1126/science.1165771.

Marraffini LA. Impact of CRISPR immunity on the emergence of bacterial pathogens. *Future Microbiol*. 2010;5(5):693-5. doi: 10.2217/fmb.10.38.

Martin A, Fahrbach K, Zhao Q, Lodise T. Association between carbapenem resistance and mortality among adult, hospitalized patients with serious infections due to *Enterobacteriaceae*: results of a systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(7):ofy150. doi: 10.1093/ofid/ofy150.

Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.

Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:82–9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x.

Mascarenhas MS, Nascimento FDS, Rocha AJ, Ferreira MDS, Oliveira WDDS, Morais Lino LS, i sur. Use of CRISPR Technology in Gene Editing for Tolerance to Biotic Factors in Plants: A Systematic Review. *Curr Issues Mol Biol*. 2024;46(10):11086-11123. doi: 10.3390/cimb46100659.

Masi M, Winterhalter M, Pagès JM. Outer Membrane Porins. *Subcell Biochem*. 2019;92:79–123. doi: 10.1007/978-3-030-18768-2_4.

Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenić B, Kalenić S, i sur. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(3):532-4. doi: 10.3201/eid1803.110389.

Męcik M, Stefaniak K, Harnisz M, Korzeniewska E. Hospital and municipal wastewater as a source of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in the environment: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2024;31(36):48813-48838. doi: 10.1007/s11356-024-34436-x.

Mitić D. Mehanizmi regulacije sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2023. [pristupljeno 25.02.2025.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:557423>.

Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, Van Der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*. 2016;353(6299):aad5147. doi:10.1126/science.aad5147.

Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000;36(1):244-6. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez - Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995;17(1):85–93. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x.

Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2):174–82. doi:10.1007/s00239-004-0046-3.

Montazeri EA, Saki M, Savari M, Meghdadi H, Akrami S. Association between the presence of CRISPR-Cas system genes and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients admitted in Ahvaz teaching hospitals. *BMC Infect Dis*. 2024;24(1):1117. doi:10.1186/s12879-024-10018-7.

Morris LGT, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*. 2015;121(9):1357–68. doi:10.1002/cnrc.29140.

Nakata A, Amemura M, Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K12 chromosome. *J Bacteriol*. 1989;171(6):3553–6. doi:10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989.

Narayanan N, Johnson L, MacDougall C. Beyond Susceptible and Resistant, Part III: Treatment of infections due to Gram-Negative organisms producing carbapenemases. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016;21(2):110–9. doi: 10.5863/1551-6776-21.2.110.

Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252–75. doi: 10.1093/femsre/fux013.

Neumann B, Stürhof C, Rath A, Kieninger B, Eger E, Müller JU i sur. Detection and characterization of putative hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in microbiological diagnostics. *Sci Rep.* 2023;13(1):19025. doi: 10.1038/s41598-023-46221-w.

Newire E, Aydin A, Juma S, Enne VI, Roberts AP. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas system located exclusively on IncHI1B/IncFIB plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Front Microbiol.* 2020;11:1937. doi: 10.3389/fmicb.2020.01937.

Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(1):23-37. doi: 10.1517/14656566.9.1.23.

Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(6):321–31. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x.

Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):718–21. doi: 10.1128/JCM.01773-10.

Novak A, Goic-Barisic I, Andrasevic AT, Butic I, Radic M, Jelic M, i sur. Monoclonal outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in intensive care unit, University Hospital Centre Split, Croatia. *Microb Drug Resist.* 2014;20(5):399-403. doi: 10.1089/mdr.2013.0203.

Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 1987;51(4):381–95.

Nuñez JK, Lee AS, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature.* 2015;519(7542):193-8. doi: 10.1038/nature14237.

Ochońska D, Brzychczy-Włoch M. *Klebsiella pneumoniae* – Taxonomy, Occurrence, Identification, Virulence Factors and Pathogenicity. *Adv Microbiol.* 2024;63(3):157–75. doi: 10.2478/am-2024-0014.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, i sur. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase in *Serratia marcescens* that shows

imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(1):71-8. doi: 10.1128/AAC.38.1.71.

Ostria-Hernández ML, Sánchez-Vallejo CJ, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Res Notes.* 2015;8:332. doi: 10.1186/s13104-015-1285-7.

Owaid HA, Al-Ouqaili MTS. Molecular and bacteriological investigations for the co-existence CRISPR/Cas system and β -lactamases of types extended-spectrum and carbapenemases in Multidrug, Extensive drug and Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Saudi J Biol Sci.* 2024;31(7):104022. doi: 10.1016/j.sjbs.2024.104022.

Özcan A, Pausch P, Linden A, Wulf A, Schühle K, Heider J i sur. Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nat Microbiol.* 2019;4(1):89-96. doi: 10.1038/s41564-018-0274-8.

Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):177–83. doi: 10.1128/AAC.00715-09.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-60. doi: 10.1128/AAC.00296-11.

Patel B, Hopkins KL, Freeman R, Pople D, Brown CS, Robotham JV. Carbapenemase - producing Enterobacterales: a challenge for healthcare now and for the next decade. *Infect Prev Pract.* 2020;2(3):100089. doi: 10.1016/j.infpip.2020.100089.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.

Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA i sur. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(4):521-547. doi: 10.1016/j.cmi.2021.11.025.

Pinilla-Redondo R, Mayo-Muñoz D, Russel J, Garrett RA, Randau L, Sørensen SJ, i sur. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(4):2000–12. doi: 10.1093/nar/gkz1197.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589–603.

Poirel L, Lambert T, Türkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(2):546-52. doi: 10.1128/AAC.45.2.546-552.2001.

Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-606. doi: 10.1093/jac/dks121.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119-23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.

Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31):20549. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.31.20549.

Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005;151(Pt 3):653–63. doi:10.1099/mic.0.27437-0.

Pristaš I, Ujević J, Bodulić K, Andrijašević N, Bedenić B, Payerl-Pal M i sur. The Association between Resistance and Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in High-Risk Clonal Lineages ST86 and ST101. *Microorganisms.* 2024;12(10):1997. doi: 10.3390/microorganisms12101997.

Pu D, Zhao J, Chang K, Zhuo X, Cao B. "Superbugs" with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. *Sci Bull (Beijing).* 2023;68(21):2658-2670. doi: 10.1016/j.scib.2023.09.040.

Pursey E, Dimitriu T, Paganelli FL, Westra ER, van Houte S. CRISPR-Cas is associated with fewer antibiotic resistance genes in bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2022;377(1842):20200464. doi: 10.1098/rstb.2020.0464.

Qin M, Deng C, Wen L, Luo G, Meng Y. CRISPR-Cas and CRISPR-based screening system for precise gene editing and targeted cancer therapy. *J Transl Med*. 2024;22(1):516. doi: 10.1186/s12967-024-05235-2.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440–58. doi: 10.1128/CMR.00001-07.

Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, Albayat H, Al-Adsani W, Sabour AA, i sur. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant Enterobacterales. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(11):1675. doi: 10.3390/medicina58111675.

Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy*. 2012;32(5):399-407. doi: 10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015;117:119-28. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.

Rocha J, Henriques I, Gomila M, Manaia CM. Common and distinctive genomic features of *Klebsiella pneumoniae* thriving in the natural environment or in clinical settings. *Sci Rep*. 2022;12(1):10441. doi: 10.1038/s41598-022-14547-6.

Rodrigues D, Baldissera GS, Mathos D, Sartori A, Zavascki AP, Rigatto MH. Amikacin for the treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: clinical efficacy and toxicity. *Braz J Microbiol*. 2021;52(4):1913-1919. doi: 10.1007/s42770-021-00551-x.

Russo A, Fusco P, Morrone HL, Trecarichi EM, Torti C. New advances in management and treatment of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2023;21(1):41-55. doi: 10.1080/14787210.2023.2151435.

Russo TA, MacDonald U, Hassan S, Camanzo E, LeBreton F, Corey B, i sur. An Assessment of Siderophore Production, Mucoviscosity, and Mouse Infection Models for Defining the

Virulence Spectrum of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*. 2021;6(2):e00045-21. doi:10.1128/mSphere.00045-21.

Saisho Y, Katsube T, White S, Fukase H, Shimada J. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacteria, in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(3):e02163-17. doi: 10.1128/AAC.02163-17.

Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*. 2003;327(7425):1209–13. doi: 10.1136/bmj.327.7425.1209.

Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy. *Drugs*. 2012;72(1):1–16. doi: 10.2165/11597960-000000000-00000.

Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:175-80. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01868.x.

Shah PM, Isaacs RD. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):538-42. doi: 10.1093/jac/dkg404.

She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, i sur. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(14):7835–40. doi: 10.1073/pnas.141222098.

Shen J, Lv L, Wang X, Xiu Z, Chen G. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J Basic Microbiol*. 2017;57(4):325-336. doi: 10.1002/jobm.201600589.

Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an update on therapeutic options. *Front Microbiol*. 2019;10:80. doi: 10.3389/fmicb.2019.00080.

Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, i sur. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(3):169–82. doi:10.1038/nrmicro.2016.184.

Silva JT, López-Medrano F. Cefiderocol, a new antibiotic against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Rev Esp Quimioter*. 2021;34(Suppl 1):41-43. doi: 10.37201/req/s01.12.2021.

Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;241(2):129-34. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.015.

Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amitai G, Sorek R. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet*. 2010;26(8):335-40. doi: 10.1016/j.tig.2010.05.008.

Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7. doi: 10.1038/nature13011.

Strohl WR. Industrial antibiotics: today and the future. U: Strohl WR, ur. *Biotechnology of antibiotics*. 2. izd. New York: Marcel Dekker; 1997. str. 1-47.

Sun Q, Wang Y, Dong N, Shen L, Zhou H, Hu Y i sur. Application of CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Studying the Mechanism of Pandrug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(7):e00113-19. doi: 10.1128/AAC.00113-19.

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, i sur. WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

Taggar G, Attiq Rheman M, Boerlin P, Diarra MS. Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from humans, animals, food and the environment. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(10):693. doi: 10.3390/antibiotics9100693.

Tambić Andrašević A, Lucić S, Tambić T. Antibiotic resistance in Croatia. *Med Flum*. 2018;54(3):312–21.

Tambić Andrašević A, Tambić T, Žmak LJ, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelac D, i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2019. g. Zagreb, Hrvatska: INTERGRAF-BI; 2019. str. 85-97.

Tang M, Kong X, Hao J, Liu J. Epidemiological characteristics and formation mechanisms of multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2020;11:581543. doi: 10.3389/fmicb.2020.581543.

Tao S, Chen H, Li N, Liang W. The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist*. 2022;15:4155-4168. doi: 10.2147/IDR.S370869.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH i sur. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.

Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1019–25. doi: 10.1128/JCM.00219-10.

Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S i sur. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2091-7. doi: 10.1093/jac/dku105.

Wang G, Song G, Xu Y. Association of CRISPR/Cas system with the drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1929-1935. doi: 10.2147/IDR.S253380.

Wang J, Yuan M, Chen H, Chen X, Jia Y, Zhu X, i sur. First report of *Klebsiella oxytoca* strain simultaneously producing NDM-1, IMP-4, and KPC-2 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):e00877-17. doi: 10.1128/AAC.00877-17.

Wang L, Gu H, Lu X. A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11:9. doi: 10.1186/1476-0711-11-9.

Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z i sur. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(23):e01834-18. doi: 10.1128/AEM.01834-18.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51. doi: 10.1128/AAC.35.1.147.

Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y i sur. Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the detection of genes encoding *Enterobacteriaceae* carbapenemase. *Jpn J Infect Dis*. 2020;73(2):166-172. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.041.

Watts JL, Shyrock TR, Apley M, Bade DJ, Brown SD, Gray JT i sur. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2007;28:1-56.

Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(10):704-712. doi: 10.1016/j.cmi.2017.09.001.

Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):344–59. doi: 10.1038/s41579-019-0315-1.

Xue C, Sashital DG. Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus*. 2019;8(2):10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2019. doi: 10.1128/ecosalplus.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, i sur. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54. doi: 10.1128/AAC.00774-09.

Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7267-72. doi: 10.1073/pnas.1500107112.

Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(6):519-526. doi: 10.1080/14787210.2017.1316193.

Zhanel GG, Simor AE, Vercaigne L, Mandell L; Canadian Carbapenem Discussion Group. Imipenem and meropenem: Comparison of in vitro activity, pharmacokinetics, clinical trials and adverse effects. *Can J Infect Dis*. 1998;9(4):215-28. doi: 10.1155/1998/831425.

Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(1):79–101. doi: 10.3109/1040841X.2012.691460.

Zheng Y, Li J, Wang B, Han J, Hao Y, Wang S i sur. Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:62. doi: 10.3389/fbioe.2020.00062.

Zujić Atalić V, Bedenić B, Kocsis E, Mazzariol A, Sardelić S, Barišić M i sur. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia--the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(11):O894-903. doi: 10.1111/1469-0691.12635.

ŽIVOTOPIS

Ivana Jurić rođena je 4. listopada 1995. godine u Zagrebu. Odrasla je u Kninu, gdje je 2014. godine završila opću gimnaziju u Srednjoj školi "Lovre Monti". Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu stekla je zvanje magistre molekularne biologije 2019. godine, a tijekom studiranja razvila je veliki interes za mikrobiologiju, molekularnu dijagnostiku i medicinsku genetiku te je odradila laboratorijsku praksu u Laboratoriju za genetičko inženjerstvo i bila demonstratorica na kolegiju Mikrobiologija. Volontirala je na znanstveno-popularizacijskom događaju Noć Biologije (2016. i 2017.) i sudjelovala na simpoziju "Power of Microbes in Industry and Environment" 2016. godine. Bila je članica Udruge studenata biologije (BIUS), unutar Sekcije za mikrobiologiju i Sekcije za genetiku. U Udruzi eSTUDENT (2017.-2018.) bila je jedna od organizatorica i voditeljica konferencije "Mozak voli zdravo" te je sudjelovala u organizaciji projekata "Znanost za sve" i "Znanstveni piknik".

Nakon studentskih poslova u farmaceutske industriji i kraćeg zaposlenja u firmi Shimadzu d.o.o. tijekom 2020. godine, od siječnja 2021. godine zaposlena je kao molekularni biolog u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Odjelu za molekularnu mikrobiologiju. Iste godine je upisala Sveučilišni poslijediplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Kao molekularni biolog s gotovo petogodišnjim iskustvom rada u kliničkom okruženju, stekla je stručnost u tehnikama molekularne mikrobiologije, validaciji metoda te analizi i interpretaciji rezultata iz kliničkih uzoraka. Kroz doktorsko istraživanje aktivno doprinosi znanstvenoj zajednici, a područje njezinog znanstvenog interesa obuhvaćaju molekularne metode u dijagnostici mikroba, mehanizmi antimikrobne otpornosti i sustav CRISPR-Cas. Poseban fokus njezinog rada je istraživanje sustava CRISPR-Cas kod višestruko otpornih sojeva *Klebsiella pneumoniae*. Sudjelovala je na deset kongresa i simpozija, gdje je na jednom održala predavanje te je objavila dva znanstvena rada i jedan kratki izvještaj.