

Određivanje rezistencije na klaritromicin i levofloksacin metodom PCR u bakterije *Helicobacter pylori* izolirane iz sluznice želuca

Dadić, Blanka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:469824>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Odjel za biologiju

Blanka Dadić

**ODREĐIVANJE REZISTENCIJE NA KLARITROMICIN I
LEVOFLOKSACIN METODOM PCR U BAKTERIJE
HELICOBACTER PYLORI IZOLIRANE IZ SLUZNICE
ŽELUCA**

Diplomski rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Odjel za biologiju

Blanka Dadić

**ODREĐIVANJE REZISTENCIJE NA KLARITROMICIN I
LEVOFLOKSACIN METODOM PCR U BAKTERIJE
HELICOBACTER PYLORI IZOLIRANE IZ SLUZNICE
ŽELUCA**

Diplomski rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam diplomski rad s naslovom

ODREĐIVANJE REZISTENCIJE NA KLARITROMICIN I LEVOFLOKSACIN METODOM PCR U BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI* IZOLIRANE IZ SLUZNICE ŽELUCA

izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica
Blanka Dadić

ZAHVALA

Beskrajno hvala mentoru doc. dr. sc. Ivici Šamaniću na znanju koje mi je pruženo tijekom izrade diplomskog rada i tijekom cjelokupnog obrazovanja. Hvala na posvećenom vremenu, strpljenju i podršci mojih ideja. Hvala od srca jer ste završetak mog fakultetskog obrazovanja učinili zaista posebnim!

Hvala izv. prof. dr. sc. Ani Maravić na prenesenom znanju, vrijednim savjetima i sveobuhvatnoj pomoći. Hvala što ste mi omogućili rad u laboratoriju za mikrobiologiju i dali važan doprinos u izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se doktorandici Miji Đželaliji na prenesenom znanju, strpljenju i posvećenom vremenu u laboratoriju.

Posebno hvala prof. dr. sc. prim. Mariji Tonkić, dr. med. na mikrobiološkim uzorcima i ostvarenoj suradnji kojom ste omogućili realizaciju ovog istraživanja.

Također, hvala profesoru Mirku Ruščiću na metodičkom znanju potrebnom za oblikovanje i provedbu nastave.

Zahvaljujem se obitelji na pruženoj podršci tijekom obrazovanja kojeg ste mi omogućili. Hvala na vašim savjetima, razgovorima, brizi i toplim riječima jer vidim koliko ste ponosni na moj uspjeh koji je ujedno i vaš.

Ujedno se zahvaljujem svojim divnim prijateljima na provedenom vremenu u učenju, gdje smo se međusobno ohrabivali, da bi danas stigli do našeg cilja.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

ODREĐIVANJE REZISTENCIJE NA KLARITROMICIN I LEVOFLOKSACIN METODOM PCR U BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI* IZOLIRANE IZ SLUZNICE ŽELUCA

Blanka Dadić

SAŽETAK

Helicobacter pylori je patogena bakterija koja je uzročnik gastrointestinalnih bolesti poput gastritisa, peptičkog ulkusa i raka želuca kod čovjeka. Tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je značajan porast rezistencije *H. pylori* na mnoge antibiotike uključujući klaritromicin i levofloksacin. Uzrok rezistencije klaritromicina i levofloksacina su točkaste mutacije u genetičkoj sekvenci koje ometaju staničnu aktivnost antibiotika mijenjajući ciljno mjesto lijeka. Cilj diplomskog rada bila je molekularna karakterizacija ili analiza sekvenci triju gena čije mutacije su povezane sa rezistencijom na antibiotike klaritromicin i levofloksacin. U ovom istraživanju identificiran je niz mutacija u genu 23s rRNA odgovornih za rezistenciju na klaritromicin te mutacije u podjedinici A DNA giraze koje su povezane sa rezistencijom na levofloksacin. Nisu detektirane mutacije u podjedinici B DNA giraze ključne za rezistenciju na levofloksacin. Isto tako uočena je višestruka rezistencija što ukazuje na uspješan razvoj otpornosti na različite antibiotike i posljedično povećani rizik za ljudsko zdravlje.

Ključne riječi: antibiotska rezistencija, 23s rRNA, *gyrA*, *gyrB*

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 64 + VII stranica, 20 grafičkih prikaza, 11 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Dr. sc. Ana Maravić, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., asistentica na projektu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad prihvaćen: rujan, 2022.

Basic documentation card

University of Split

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

DETECTION OF CLARITHROMYCIN AND LEVOFLOXACIN RESISTANCE BY THE PCR METHOD IN *HELICOBACTER PYLORI* FROM GASTRIC BIOPSY SPECIMENS

Blanka Dadić

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a pathogenic bacterium that causes gastrointestinal diseases such as gastritis, peptic ulcer and stomach cancer in humans. Over the past two decades there has been a significant increase in *H. pylori* resistance to many antibiotics including clarithromycin and levofloxacin. The cause of resistance of clarithromycin and levofloxacin are point mutations in the genetic sequence that disrupt the cellular activity of antibiotics by altering the drug target site. The aim of the thesis was the molecular characterization or sequence analysis of three genes whose mutations are associated with resistance to the clarithromycin and levofloxacin. In this study a series of mutations in the 23s rRNA gene responsible for resistance to clarithromycin and mutations in DNA gyrase subunit A which are associated with resistance to levofloxacin were identified. No mutations in DNA gyrase subunit B crucial for levofloxacin resistance were detected. Multidrug resistance was also observed which indicates the successful development of resistance to different antibiotics and consequently an increased risk to human health.

Key words: antibiotic resistance, 23s rRNA, *gyrA*, *gyrB*

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 64 + VII pages, 20 figures, 11 tables and 35 references

Original language: Croatian

Mentor: Ivica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Reviewers: Ivica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Ana Maravić, Ph.D. Associate Professor of Faculty of Science, University of Split

Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., Project assistant of Faculty of Science, University of Split

Thesis accepted: September 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opće značajke bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1. Morfologija i struktura.....	1
1.1.2. Metabolizam i biokemijske značajke	2
1.1.3. Epidemiologija i prijenos.....	2
1.1.4. Patogeneza <i>H. pylori</i> i klinička slika.....	2
1.1.5. Dijagnostičke metode za otkrivanje infekcije uzrokovane <i>H. pylori</i>	4
1.1.6. Liječenje infekcije uzrokovane <i>H. pylori</i>	6
1.2. Makrolidi	7
1.2.1. Struktura i upotreba antibiotika klaritromicina	7
1.2.2. Mehanizam antibiotskog djelovanja klaritromicina.....	8
1.3. Fluorokinoloni	8
1.3.1. Struktura i upotreba antibiotika levofloksacina	8
1.3.2. Mehanizam antibiotskog djelovanja levofloksacina	9
1.4. Rezistencija <i>H. pylori</i> na klaritromicin i levofloksacin	10
1.4.1. Mehanizam rezistencije na klaritromicin u <i>H. pylori</i>	10
1.4.2. Mehanizam rezistencije na levofloksacin u <i>H. pylori</i>	12
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Uzgoj <i>H. pylori</i> izolirane iz sluznice želuca	13
2.2. Izolacija genomske DNA iz <i>H. pylori</i>	14
2.3. Mjerenje koncentracije izolirane DNA	15
2.4. Umnožavanje gena 23s rRNA, <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) 16	
2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	18
2.6. Pročišćavanje molekula DNA iz fragmenta gela agaroze.....	19
2.7. Sekvenciranje PCR produkata	20
3. REZULTATI.....	21
3.1. Određivanje osjetljivosti izolata <i>H. pylori</i> na klaritromicin i levofloksacin	21
3.2. Detekcija rezistencije na klaritromicin i levofloksacin metodom PCR.....	22
3.2.1. Detekcija gena 23s rRNA	22
3.2.2. Detekcija gena <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i>	24
3.3. Bioinformatička analiza sekvenci	25
3.3.1. Analiza slijeda nukleotida V domene 23s rRNA gena iz izolata bakterije <i>H. pylori</i> 25	
3.3.2. Analiza slijeda nukleotida gena DNA giraze, podjedinice A (<i>gyrA</i>) izolata bakterije <i>H. pylori</i> 29	

3.3.3. Analiza slijeda nukleotida gena DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori* 35

4. RASPRAVA.....	41
5. ZAKLJUČAK	44
6. METODIČKI DIO.....	45
POPIS SLIKA	57
POPIS TABLICA.....	59
POPIS LITERATURE	60
SKRAĆENICE.....	64

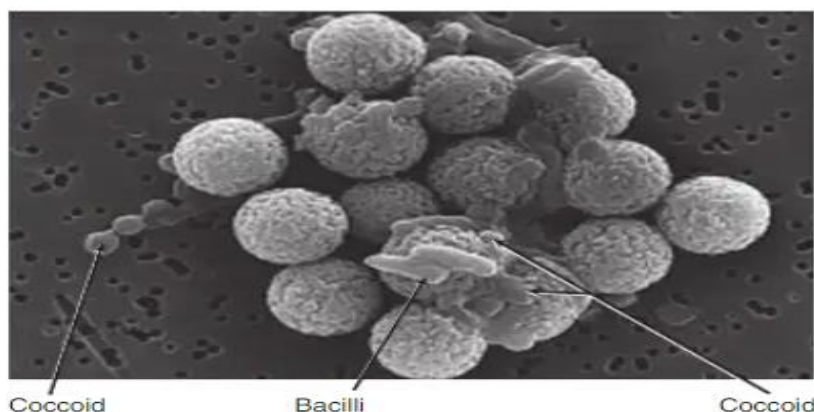
1. UVOD

1.1. Opće značajke bakterije *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je gram-negativna bakterija koja pripada razredu *Epsilonproteobacteria*, redu *Campylobacterales*, porodici *Helicobacteraceae* i rodu *Helicobacter*. Godine 1983. znanstvenici Barry Marshall i Robin Warren opisali su je kao vrstu *Campylobacter pyloridis*, odnosno klasificirali u rod *Campylobacter* zbog morfološke sličnosti kampilobakterijama¹. Godine 1989. izdvojena je iz roda *Campylobacter* zbog temeljnih razlika u taksonomskim svojstvima te su je Goodwin i sur. opisali kao vrstu *H. pylori*^{1,2}. Danas je opisano preko 40 vrsta iz roda *Helicobacter* koje su podijeljene na vrste koje koloniziraju želudac (*H. pylori*) ili crijeva (*H. cinaedi* i *H. fennelliae*). *H. pylori* je klinički značajna vrsta, odnosno odgovorna je za različite gastrointestinalne bolesti poput gastritisa, peptičkog ulkusa i raka želuca kod čovjeka.

1.1.1. Morfologija i struktura

Mikromorfološki gledano, *H. pylori* je zavijeni bacil širok 0.5-1 μm , dugačak 2-4 μm te ima sposobnost pretvorbe iz zavijenog oblika u formu kokoida^{1,3}. Zavijeni oblik omogućuje pokretljivost, a oblik kokoida povećava sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima želuca i pospješuje kolonizaciju sluznice želuca (Slika 1). Na jednom polu sadrži 4-6 bičeva s ovojnicom što omogućuje znatnu pokretljivost kroz želučanu sluz (Slika 2). Građena je poput ostalih gram-negativnih bakterija, odnosno od vanjske membrane, tankog peptidoglikanskog sloja i citoplazmatske opne. Vanjska membrana građena je od lipopolisaharida (LPS) koji se sastoji od središnjeg oligosaharida, O-lanca i lipida-A koji ima smanjenu endotoksičnu aktivnost⁴. O-lanac nalikuje Lewisovima antigenima krvnih grupa i tako štiti bakteriju od imunosne reakcije domaćina^{3,5}.



Slika 1. Zavijeni oblik i oblik kokoida *H. pylori* (izvor: Murray P.R. i sur., 2021).



Slika 2. Mikromorfološka struktura *H. pylori* (izvor: <https://fineartamerica.com/featured/tem-of-helicobacter-pylori-bacteria-nibscscience-photo-library.html>).

1.1.2. Metabolizam i biokemijske značajke

H. pylori je mikroaerofilna bakterija jer za rast joj je potrebna smanjena koncentracija kisika i povišena koncentracija ugljikova dioksida. Uzgaja se na krutim hranjivim podlogama koje sadrže krv, škrob i serum te inkubira tri do sedam dana u mikroaerofilnim uvjetima pri optimalnoj temperaturi od 37 °C⁵. Raste u obliku sitnih, glatkih, bezbojnih i prozirnih kolonija veličine promjera 1-2 mm. Ostvaruje pozitivan rezultat na biokemijskim testovima oksidaza, katalaza i ureaza, međutim negativan rezultat pokazuje na testovima za određivanje fermentacije ugljikohidrata.

1.1.3. Epidemiologija i prijenos

Čovjek je glavni rezervoar *H. pylori*, a pretpostavka je da se prenosi oralnim ili feko-oralnim putem^{1,3}. U razvijenim zemljama infekcija se primarno širi zbog prijenosa između ljudi, međutim u zemljama razvoja zbog loših higijenskih uvjeta postoji mogućnost infekcije konzumacijom kontaminirane hrane i vode. U zemljama razvoja prevalencija iznosi 85-95 %, a u razvijenim zemljama iznosi 30-50 %³.

1.1.4. Patogeneza *H. pylori* i klinička slika

H. pylori primarno kolonizira sluznicu čovjekova želuca, međutim pronađena je u zubnom plaku i slini zaraženih pojedinaca¹. Patogeneza je povezana s faktorima virulencije koji uzrokuju upalne procese te mijenjaju i kontroliraju stanične odgovore domaćina. Faktori virulencije štite bakteriju, potiču kolonizaciju sluznice želuca, sprječavaju imunosnu reakciju domaćina što posljedično može uzrokovati karcinogenezu.

S obzirom da u želucu prevladava kisela sredina, *H. pylori* je razvila mehanizme koji omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Kolonizacija sluznice želuca omogućena

je povišenjem pH vrijednosti želučane sluzi i blokiranjem proizvodnje želučane kiseline. Pomoću enzima ureaze hidrolizira ureu na ugljikov dioksid i amonijak koji neutralizira pH vrijednost želučane sluzi^{1,3}. Amonijak oštećuje epitelne stanice koje su zaslužne za proizvodnju želučane sluzi. Daljnja kolonizacija postiže se aktivnim kretanjem pomoću bičeva kroz želučanu sluz i vezanjem na epitel preko površinskih adhezina. Važnost bakterijske pokretljivosti u kolonizaciji uočena je kod mutanata bez bičeva koji nemaju sposobnost kolonizacije³.

Nakon vezanja na površinski epitel *H. pylori* proizvodi vakuolizirajući citotoksin A (VacA) koji se veže za epitel pomoću adhezina. VacA potiče autofagiju, međutim u slučaju kronične izloženosti potiče stvaranje unutarstaničnih vakuola³. Sprječava aktivaciju i proliferaciju B-stanica i T-stanica te potiče apoptozu makrofaga.

Značajan čimbenik virulencije je citotoksinu pridruženi gen A (CagA) smješten na cag otoku patogenosti (engl. *cag pathogenicity island* – *cagPAI*) koji kodira istoimeni protein⁵. Cag otok patogenosti sadrži gene koji kodiraju tip 4 sekrecijski sustav putem kojeg se CagA protein injektira u stanice epitela i oštećuje citoskelet⁵. Potiče proizvodnju interleukina-8 što rezultira privlačenjem neutrofila i razvojem upalnog procesa. Sojevi *H. pylori* na temelju prisutnosti CagA gena dijele se u dvije kategorije: *cagA*⁺ i *cagA*⁻ sojevi. *CagA*⁺ sojevi povezani su s većim rizikom razvoja raka želuca⁴.

Lipopolisaharid (LPS) jest faktor virulencije koji uzrokuje kroničnu upalu. Gradi vanjsku membranu stanice, a sastoji se od središnjeg oligosaharida, lipida-A i O-lanca. O-lanac nalikuje Lewisovima antigenima krvnih grupa i tako štiti bakteriju od imunosne reakcije domaćina. Lipopolisaharid sudjeluje u zaštiti od tvari koje imaju toksičan učinak na bakterijske stanice. Potiče oslobađanje različitih interleukina (IL-8, IL-10, IL-12), aktivira neutrofile što rezultira daljnjim razvojem upalnog procesa.

Infekcija uzrokovana bakterijom *H. pylori* prvenstveno dovodi do razvoja akutnog gastritisa. Gastritis nastaje kao posljedica upale želučanog epitela i oštećenja želučane sluzi¹. Simptomi akutnog gastritisa su mučnine, povraćanje i smanjena produkcija želučane kiseline⁵. Akutni gastritis se kod određenog broja pojedinaca može razviti u kronični gastritis.

U 10-15 % osoba s kroničnim gastritisom razvija se i peptički ulkus⁵. Glavni uzročnici nastanka peptičkog ulkusa su *H. pylori* i/ili korištenje nesteroidnih antireumatika. Ulkusi nastaju na prijelazu između tijela i antruma želuca (ulkus želuca) ili na proksimalnom dijelu dvanaesnika (ulkus dvanaesnika). Simptomi peptičkog ulkusa su bol u gornjem dijelu abdomena, nadutost, mučnina i vrlo brza zasićenost obrokom¹.

Svjetska zdravstvena organizacija svrstava *H. pylori* u kategoriju 1. karcinogenih tvari i pronađena je poveznica između infekcije i rizika razvoja raka želuca³. Postoje dva načina kojim infekcija potiče nastanak raka želuca. Prvi način je indirektno preko upalnih procesa, odnosno infekcija uzrokuje upalni proces koji posljedično omogućuje nakupljanje pogrešaka tijekom mitoze⁶. Makrofagi i neutrofilni proizvode reaktivne kisikove spojeve (ROS) i reaktivne dušikove spojeve (RNS) koji potiču oksidativni stres i oštećenje molekule DNA. Tijekom upalnog procesa, u želučanim epitelnim stanicama odvija se nepravilna metilacija molekule DNA što može imati „tihi“ učinak na tumor supresorske gene.

Drugi način je direktno preko faktora virulencije⁶. Faktori virulencije VacA i CagA zaslužni su za stvaranje prekancerogenih želučanih lezija i razvoja zloćudnog oblika tumora.

1.1.5. Dijagnostičke metode za otkrivanje infekcije uzrokovane *H. pylori*

Razvijene su različite dijagnostičke metode za potvrđivanje infekcije *H. pylori*. Dijagnostičke metode dijele se na: invazivne dijagnostičke metode i neinvazivne dijagnostičke metode.

1.1.5.1. Invazivne dijagnostičke metode

U invazivnim dijagnostičkim metodama je potrebno provesti endoskopiju i biopsiju, zatim se uzorci testiraju pomoću brzog ureaza testa, histoloških ili molekularnih metoda i uzgojem na hranjivim podlogama.

Brzi ureaza test je jednostavan i pouzdan test visoke osjetljivosti i specifičnosti (>90 %) ⁷. Biopstat sluznice želuca dodaje se u otopinu koja sadrži ureu i pH indikator. Pozitivan rezultat ostvaren je ako se boja indikatora promjeni zbog hidrolize uree na amonijak i ugljikov dioksid. Histološke metode su izrazito korisne jer pružaju mogućnost razlikovanja tipova gastritisa. Histološki testovi pokazali su veću specifičnost i osjetljivost u odnosu na urea izdisajni test i brzi urea test. Uzorci sluznice želuca boje se hematoksilinom i eozinom kako bi se procijenio stupanj upalnog procesa, a bojenje po Giemsi razlučuje ostale patogene organizme od *H. pylori*⁷. Točnost metode ovisi o broju i mjestu provedene biopsije. Metodu je moguće provesti koristeći jedan uzorak, ali veći broj uzoraka omogućuje pouzdanije i preciznije rezultate. S obzirom da *H. pylori* znatno oštećuje sluznicu želuca potrebno je uzeti uzorke s područja tijela i izlaznog dijela želuca.

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je molekularni test koji se koristi za identifikaciju infekcije *H. pylori*. Metoda PCR može biti invazivna ili neinvazivna ovisno o vrsti uzorka (biopstat želučane sluznice, stolica ili slina)⁷. Metoda PCR zahtijeva odabir ispravnih početnica i gena (23s rRNA, 16s rRNA, CagA ili VacA).

1.1.5.2. Neinvazivne dijagnostičke metode

Temelje se na identifikaciji bakterijskih enzima, antitijela, antigena ili DNA sekvenci. U neinvazivne dijagnostičke metode uvrštavaju se urea izdisajni test, test za dokazivanje antigena u stolici, molekularni i serološki testovi.

Urea izdisajni test je test kojim se dokazuje prisutnost i aktivnost enzima ureaze. Pojedinaac uzima ureu obilježenu izotopima ugljika ^{13}C ili ^{14}C , međutim češće se koristi izotop ^{13}C jer je stabilniji i neradioaktivan. Nakon određenog vremena dokazuje se prisutnost obilježenog ugljikova dioksida u izdahnutom zraku, a mjeri se pomoću masene spektrometrije ili infracrvene spektroskopije. Test je izrazito precizan, visoke osjetljivosti (95.9 %) i specifičnosti (95.7 %)⁷.

Test za dokazivanje antigena u stolici je brz i jednostavan test visoke osjetljivosti (94 %) i specifičnosti (97 %)⁷. Temelji se na identifikaciji antigena u stolici jer se *H. pylori* veže za želučani epitel te izlučuje u stolicu. Postoje dvije vrste ovog testa, a to su enzimski imuno test (EIA) i imunokromatografski test (ICA) koji koriste monoklonalna ili poliklonalna antitijela. Serološki testovi identificiraju antitijela nastala imunosnom reakcijom na infekciju. Identifikacija se odvija pomoću ELISA testa, enzimskog imuno testa te imunoblotinga, a kao uzorak koristi se urin, slina ili serum. Postoje testovi za dokazivanje IgG, IgA i IgM antitijela, no test za dokazivanje IgG antitijela je jedini pouzdan. Serološki testovi mogu biti učinkoviti kod pacijenata koji su podvrgnuti terapiji antibioticima što omogućuje dijagnosticiranje infekcije kod pacijenata koji imaju gastrointestinalno krvarenje, kronični gastritis ili rak želuca. Nedostatak seroloških testova je nemogućnost potvrde preboljenja zbog prisutnosti IgG antitijela nekoliko mjeseci nakon terapije⁷. Nadalje, na početku infekcije razina antitijela je vrlo niska i serološki testovi rezultiraju lažno negativnim vrijednostima⁷.

1.1.6. Liječenje infekcije uzrokovane *H. pylori*

Liječenje infekcije zahtijeva kombinaciju antibiotika, antisekretornih agensa te inhibitora protonskih pumpi¹. Uloga antisekretornih agensa je povišenje pH vrijednosti želučane kiseline radi postizanja baktericidnog djelovanja antibiotika. Terapije uključuju korištenje različitih antibiotika jer upotreba samo jednog antibiotika može uzrokovati antibiotsku rezistenciju¹. Liječenje najčešće započinje trostrukom terapijom, odnosno pacijenti uzimaju antibiotik klaritromicin u kombinaciji s amoksicilinom te inhibitorima protonske pumpe u periodu 7-14 dana⁴. Klaritromicin se koristi kao „prva linija obrane“ zbog učinkovitog djelovanja na infekciju. Ukoliko trostruka terapija nije uspješna provodi se četverostruka terapija koja uključuje antibiotike tetraciklin i metronidazol u kombinaciji s inhibitorima protonske pumpe i bizmutom⁴.

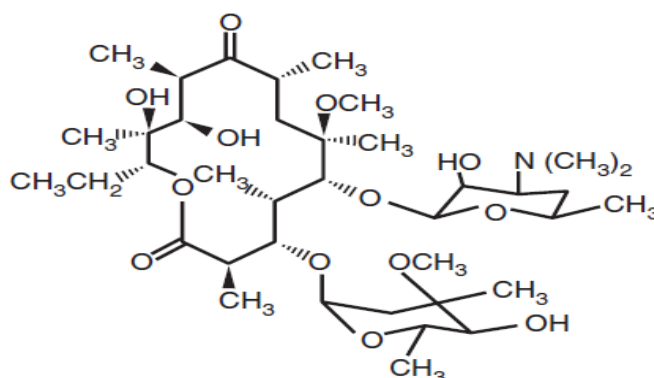
U slučajevima kada prvotne terapije ne pokazuju uspjeh provode se sekundarne terapije. Sekundarne terapije mogu biti levofloksacin trostruka terapija (levofloksacin, amoksicilin te inhibitori protonske pumpe) ili trostruka terapija (metronidazol, amoksicilin te inhibitori protonske pumpe)⁴.

1.2. Makrolidi

Makrolidi su antibiotici širokog spektra djelovanja kojima pripadaju klaritromicin, eritromicin i azitromicin. Pripadaju skupini antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina. Učinkovito djeluju na brojne gram-pozitivne bakterije, određene gram-negativne bakterije i na bakterije bez stanične stijenke. Koriste za liječenje kožnih infekcija te infekcija dišnog, probavnog i spolnog sustava⁸. Osnova strukture makrolida je veliki ciklički laktoski prsten povezan sa šećerima deozamin i kladinoza⁵.

1.2.1. Struktura i upotreba antibiotika klaritromicina

Klaritromicin i eritromicin svrstani su u istu kategoriju zbog strukturne sličnosti. Građeni su od četrnaesteročlanog laktoskog prstena, međutim klaritromicin umjesto hidroksilne skupine sadrži metoksi skupinu na šestom ugljikovom atomu laktoskog prstena (Slika 3.)^{4,7}.



Slika 3. Struktura klaritromicina (izvor: Bennett J.E. i sur., 2015).

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration - FDA*) odobrila je klaritromicin za liječenje različitih bakterijskih infekcija. Koristi se za liječenje akutne upale srednjeg uha uzrokovane bakterijama *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*⁴. Pruža učinkovito liječenje tonzilitisa i faringitisa uzrokovanih bakterijom *Streptococcus pyogenes*⁴. Upotrebljava se za liječenje akutnog bronhitisa, pneumonije, ranog stadija lajmske bolesti i kožnih infekcija uzrokovanih bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*⁴. Djeluje na uzročnike mikobakterioza – *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium intracellulare*⁴. Glavna je komponenta trostruke terapije s kojom započinje liječenje infekcije uzrokovane *H. pylori*.

1.2.2. Mehanizam antibiotskog djelovanja klaritromicina

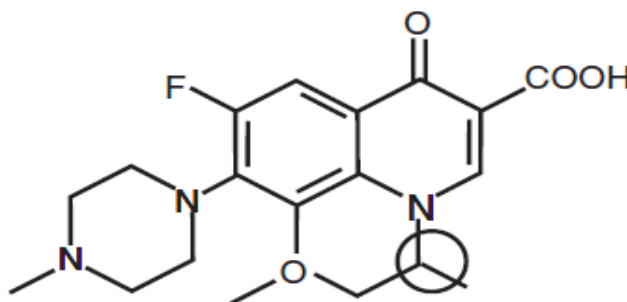
Antibiotsko djelovanje klaritromicina pruža bakteriostatski učinak, a farmakokinetička svojstva poput apsorpcije putem želučane sluzi i stabilnost u kiselom mediju omogućuju liječenje infekcije uzrokovane *H. pylori*⁹. Mehanizam djelovanja klaritromicina temelji se inhibiciji biosinteze bakterijskih proteina. Inhibicija sinteze proteina postiže se reverzibilnim vezanjem na peptidil transferaznu petlju u domeni V 23s rRNA molekule koja izgrađuje 50S ribosomsku podjedinicu^{9,10}. Vezanje na 50S ribosomsku podjedinicu uzrokuje strukturalne promjene i otpuštanje peptidil-tRNA molekule s veznog mjesta na ribosomu što rezultira sprječavanjem elongacije peptidnog lanca^{11,12}.

1.3. Fluorokinoloni

Kinoloni su sintetički antibiotici koji prema mehanizmu djelovanja pripadaju skupini antibiotika koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina. Prvi sintetiziran kinolon je nalidiksična kiselina koja se upotrebljavala za liječenje infekcija mokraćnih puteva uzrokovanih gram-negativnim bakterijama. Osnova strukture svih derivata kinolona je kondenzirani heterociklički spoj koji na četvrtom položaju sadrži karbonilnu skupinu, a na trećem ugljikovom atomu sadrži karboksilnu skupinu⁴. Fluorokinoloni su nova generacija modificiranih kinolona koji sadrže fluorov atom na šestom ugljikovom atomu⁴. Modifikacija antibiotika omogućila je širi spektar djelovanja, primjerice na gram-negativne bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, gram-pozitivne i anaerobne bakterije.

1.3.1. Struktura i upotreba antibiotika levofloksacina

Levofloksacin pripada fluorokinolonima, skupini modificiranih kinolona. Levofloksacin uz fluorov atom sadrži metil-piperazinil na sedmom ugljikovu atomu i dodatni prsten između prvog i osmog ugljikova atoma (Slika 4.)⁴.

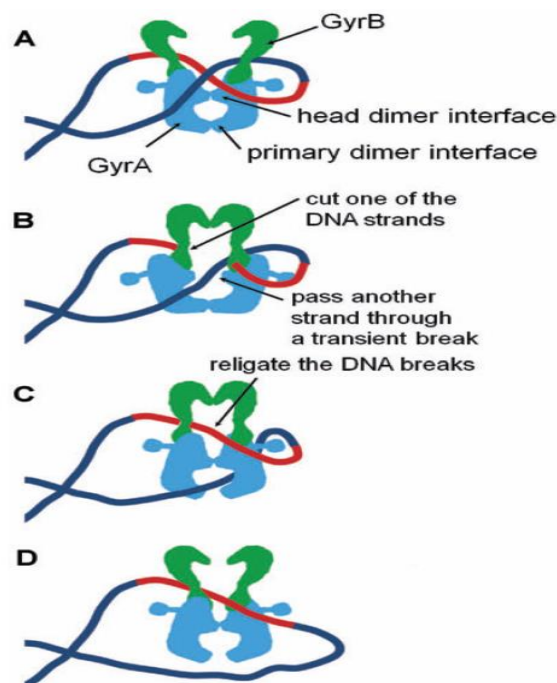


Slika 4. Struktura levofloksacina (izvor: Bennett J.E. i sur., 2015).

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration - FDA*) odobrila je levofloksacin za liječenje različitih bakterijskih infekcija. Pokazuje jaku aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama te umjerenu aktivnost prema gram-negativnim i anaerobnim bakterijama¹³. Koristi se za liječenje infekcija mokraćnog sustava, kroničnog bakterijskog prostatitisa, kožnih infekcija, plućnog oblika antraksa i akutnog bakterijskog sinusitisa⁴. Pruža učinkovito liječenje respiratornih infekcija uzrokovanih bakterijama *H. influenzae* i *M. catarrhalis* te djeluje na uzročnike atipične pneumonije - *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae*⁴.

1.3.2. Mehanizam antibiotskog djelovanja levofloksacina

Mehanizam antibiotskog djelovanja temelji se na inhibiciji sinteze molekule DNA. Levofloksacin djeluje na enzime DNA girazu (engl. *DNA gyrase*) i topoizomerazu IV (engl. *topoisomerase IV*). DNA giraza je heterotetramer građen od dvije A podjedinice kodirane genom *gyrA* i dvije B podjedinice kodirane genom *gyrB*¹⁴. Uzrokuje dvolančani lom DNA, a novi 5' kraj kovalentno je vezan za tirozin smješten u aktivnom centru podjedinice A¹⁵. Drugi lanac DNA prelazi na suprotni kraj enzima i katalizira se popravak dvolančanog loma (Slika 5). Podjedinice B imaju ATP-aznu aktivnost te potiču stvaranje i popravak dvolančanog loma



Slika 5. Mehanizam djelovanja DNA giraze

(izvor: Matsuzaki J. i sur., 2009).

Rezultati opisanog mehanizma su uklanjanje torzijske napetosti i pozitivnih superspiraliziranih zavojnica ispred replikacijskih rašlji što je ključno za provedbu replikacije DNA¹⁶.

Levofloksacin se veže na kompleks DNA-DNA giraza i sprječava popravak dvolančanog loma¹⁷. Vežanje i stabiliziranje kompleksa sprječava daljnje kretanje replikacijskih rašlji, a dvolančani lomovi DNA uzrokuju smrt stanice (baktericidni efekt).

Levofloksacin također djeluje na topoizomerazu IV, međutim sekvencioniranjem genoma *H. pylori* dokazan je nedostatak gena *parC* i *parE* koji kodiraju topoizomerazu IV¹⁴. U *H. pylori* levofloksacin djeluje samo na DNA girazu.

1.4. Rezistencija *H. pylori* na klaritromicin i levofloksacin

U približno 50 % svjetske populacije *H. pylori* kolonizira sluznicu želuca i uzrokuje različite gastrointestinalne bolesti, međutim u znatnom broju zaraženih pojedinaca ne uzrokuje simptome⁹. Liječenje najčešće započinje prvotnom trostrukom terapijom, odnosno pacijenti uzimaju klaritromicin u kombinaciji s amoksicilinom te inhibitorima protonskih pumpi u periodu 7-14 dana. Ukoliko prvotna terapija nije uspješna provode se sekundarne terapije koje sadrži kombinaciju drugih antibiotika. Primjer sekundarne terapije je levofloksacin trostruka terapija koja se sastoji od kombinacije levofloksacina, amoksicilina te inhibitora protonske pumpe. Liječenje nije uspješno u 10-30 % slučajeva, a glavni razlog neuspjeha je antibiotska rezistencija⁹. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization - WHO*) svrstava *H. pylori* na listu patogena koji zbog razvijene antibiotske rezistencije zahtijeva proizvodnju novog antibiotika i predstavlja opasnost ljudskom zdravlju⁹.

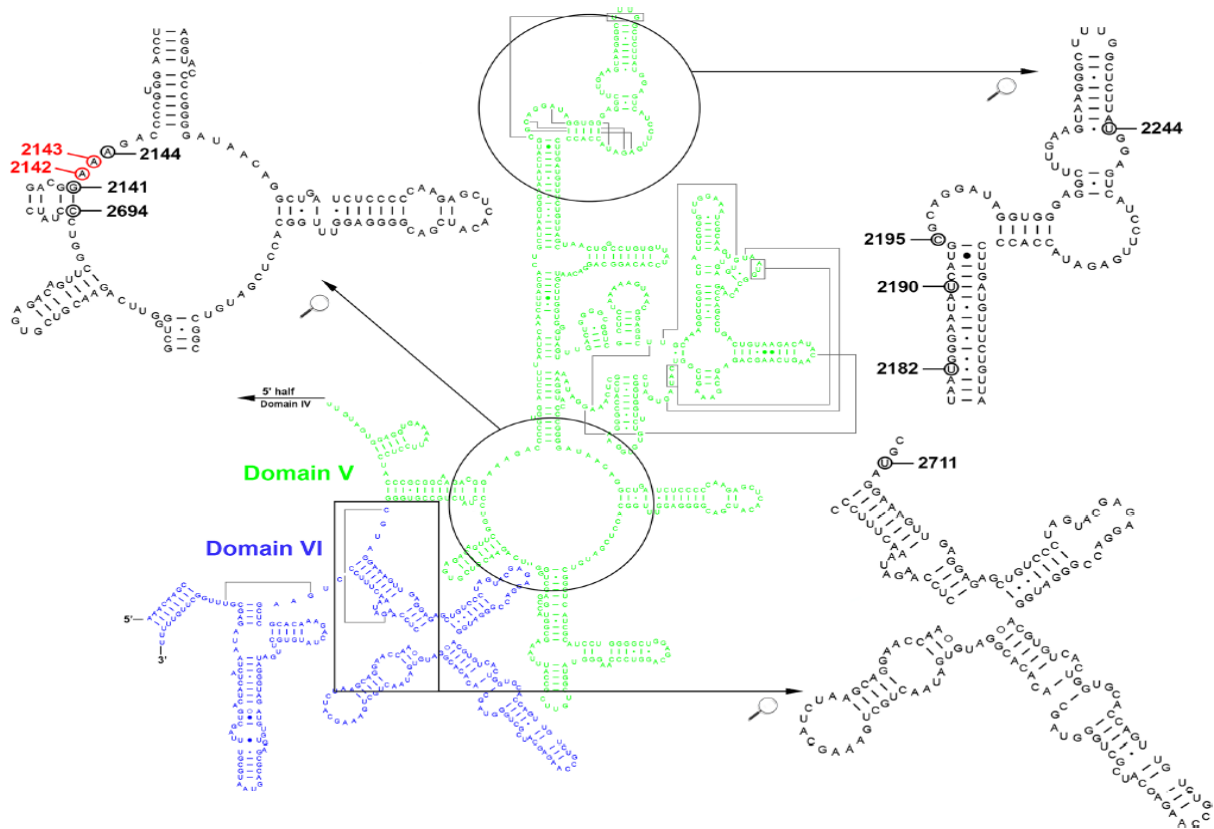
1.4.1. Mehanizam rezistencije na klaritromicin u *H. pylori*

S obzirom da se klaritromicin najčešće koristi kao „prva linija obrane“, *H. pylori* je razvio mehanizam rezistencije i to je jedan od uzroka neuspješnog liječenja i potrage za novim antibiotikom. Osnova mehanizma rezistencije je promjena u genetičkoj sekvenci koja mijenja mjesto djelovanja klaritromicina. Uzrok rezistencije su točkaste mutacije u domeni V 23s rRNA gena koje sprječavaju vezanje na 50S ribosomsku podjedinicu^{9,10}.

Postoje dvije kopije gena 23s rRNA koji je organiziran kao operon^{12,18}. Rezistencije je izražena ako su mutacije prisutne u obje kopije, međutim ako je heterozigotna mutacija soj je umjereno osjetljiv na antibiotik. Prijenos mutiranog gena između sojeva odvija se vertikalnim prijenosom putem binarne diobe¹².

Gen 23s rRNA sastoji se od šest domena, a mutacije se najčešće odvijaju u peptidil transferaznoj petlji unutar domene V i u domeni VI (Slika 6). Glavne točkaste mutacije u

peptidil transferaznoj petlji unutar domene V odvijaju se na pozicijama 2142 i 2143 gdje dolazi do tranzicije adenina u gvanin (A2142G i A2143G) i transverzije adenina u citozin na poziciji 2142 (A2142C)¹⁹. Ostale moguće mutacije u peptidil transferaznoj petlji su: A2144T, G2141A i C2694A¹². Mutacije u domeni V izvan peptidil transferazne petlje odvijaju se na pozicijama: 2182 (T2182C), 2190 (T2190C), 2195 (C2195T) i 2244 (T2244C)¹². Mutacije omogućuju daljnju sintezu bakterijskih proteina i preživljavanje unatoč visokim koncentracijama antibiotika u bakterijskoj stanici.



Slika 6. Sekundarna struktura domene V i domene VI gena 23s rRNA

(izvor: Marques A.T. i sur., 2020).

1.4.2. Mehanizam rezistencije na levofloksacin u *H. pylori*

Osnova mehanizma rezistencije je promjena u genetičkoj sekvenci koja mijenja mjesto djelovanja levofloksacina. Uzrok rezistencije su točkaste mutacije u QRDR regiji (engl. *quinolone resistance-determining region*) gena *gyrA*¹⁵. QRDR regija je smještena između 67 i 106 aminokiseline te potiče stvaranje kompleksa DNA-DNA giraza⁴. Pogrešne mutacije (engl. *missense mutations*) uzrokuju supstituciju aminokiselina asparagin (N) i asparaginska kiselina (D) na pozicijama 87 i 91^{15,20}. Na poziciji 87 odvijaju se mutacije N87K (Asn87Lys), N87I (Asn87Ile), N87T (Asn87Thr), N87Y (Asn87Tyr) i N87R (Asn87Arg), a na poziciji 91 mutacije su D91Y (Asp91Tyr), D91G (Asp91Gly), D91H (Asp91His), D91A (Asp91Ala) i D91N (Asp91Asn)^{15,20,21,22}. Mutacije se događaju i u *gyrB* genu, međutim najčešće su popraćene s mutacijama u *gyrA* genu²⁰. Pogrešne mutacije u *gyrB* genu uzrokuju supstituciju aminokiselina na pozicijama 435 (D435N), 451 (V451G), 457 (S457A), 463 (E463G), 482 (I482M) i 495 (D495H)^{21,23,24}. Navedene mutacije uzrokuju smanjeni afinitet vezanja levofloksacina za kompleks te omogućuju daljnju replikaciju molekule DNA i preživljavanje bakterijske stanice.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzgoj *H. pylori* izolirane iz sluznice želuca

Bioptati sluznice želuca uzeti su od pacijenata kojima su dijagnosticirane gastrointestinalne bolesti čiji uzročnik se smatra bakterija *H. pylori*. U Kliničkom bolničkom centru Split na Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju proveden je uzgoj *H. pylori*.

Postupak:

1. Bioptati sluznice želuca korišteni su za kultivaciju sojeva *H. pylori* na Pylori agaru (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Inokulirane ploče inkubirane su tri do pet dana u mikroaerofilnim uvjetima pri 37 °C. *H. pylori* raste u obliku sitnih, bezbojnih i prozirnih kolonija veličine promjera 1-2 mm (Slika 7.).



Slika 7. Kolonijalna morfologija *H. pylori* na krvnom agaru (foto: Blanka Dadić)

2. Ispitivanje osjetljivosti izolata na klaritromicin, levofloksacin, amoksisilin, metronidazol i tetraciklin provedeno je metodom E – testa (AB Biodisk, Solna, Švedska) na Columbia agaru (krvni agar). Krvni agar sadrži 7 % konjske krvi bez dodataka te je inokuliran s bakterijskom suspenzijom gustoće 3-4 McFarlanda. Inokulirane ploče inkubirane su 72 sata na 37 °C. Pomoću E – testa utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za slijedeće antibiotike: klaritromicin (>0.5 mg/L), levofloksacin (>1mg/L), amoksisilin (>0.125 mg/L), metronidazol (>8 mg/L) i tetraciklin (>1 mg/L). Rezultati su interpretirani prema EUCAST standardu (2021). Osjetljivost izolata na antibiotike na temelju inhibicije podijeljena je u tri skupine: osjetljivo (S), umjereno osjetljivo (I) i rezistentno (R).

2.2. Izolacija genomske DNA iz *H. pylori*

Izolacija genomske DNA iz dvadeset i jednog uzorka provedena je koristeći komercijalni kit NucleoSpin® Microbial DNA Mini kit for DNA from microorganisms (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) i pripadajući protokol²⁵.

Postupak:

1. Priprema uzoraka: jednokratnom mikrobiološkom ezom uzeta je bakterijska kultura i resuspendirana u 100 µL BE pufera za izolaciju (engl. *Elution Buffer BE*) pomoću vorteks miješalice.
2. Liziranje bakterijskih stanica: u MN tubicu s kuglicama (engl. *MN Bead tube Type B*) dodaje se bakterijska suspenzija, 40 µL MG pufera (engl. *Buffer MG*) i 10 µL tekuće proteinaze K (engl. *Liquid Proteinase K*). Tubica MN s kuglicama (engl. *MN Bead tube Type B*) miješa se pomoću vorteksa MS 12 minuta, a zatim centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja.
3. Uspostava uvjeta za vezanje DNA: dodaje se 600 µL MG pufera (engl. *Buffer MG*) i miješa tri sekunde pomoću vorteks miješalice. Centrifugiranjem 30 sekundi pri 11 000 okretaja talože se kuglice i stanični debris, a molekula DNA izdvaja u supernatant.
4. Vezivanje DNA: pomoću mikropipete uzet je supernatant i prebačen u kolonu s pozitivnim nabijenim matriksom za vezivanje DNA (engl. *NucleoSpin Microbial DNA column*) koja je postavljena u kolekcijsku tubu. Ponovno se centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja i odbacuje kolekcijska tuba s tekućim sadržajem. Kolona s pozitivnim nabijenim matriksom za vezivanje DNA (engl. *NucleoSpin Microbial DNA column*) prebacuje se u novu kolekcijsku tubu.
5. Ispiranje silika membrane: dodaje se 500 µL BW pufera (engl. *Buffer BW*), centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja i odbacuje tekući sadržaj iz kolekcijske tube. U drugom ispiranju koristi se 500 µL B5 pufera (engl. *Buffer B5*), centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja i odbacuje tekući sadržaj iz kolekcijske tube. Ponovno se centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja radi uklanjanja zaostalog B5 pufera.
6. Eluiranje ili otapanje adsorbiran: kolona s pozitivnim nabijenim matriksom za vezivanje DNA (engl. *NucleoSpin Microbial DNA column*) premješta se u novu tubu i dodaje 100 µL BE pufera za eluiranje (engl. *Elution Buffer BE*). Sadržaj se inkubira jednu minutu na sobnoj temperaturi i centrifugira 30 sekundi pri 11 000 okretaja. Određene su srednje vrijednosti koncentracija izoliranih DNA te su pohranjene na -20 °C.

2.3. Mjerenje koncentracije izolirane DNA

Korištenjem spektrofotometra određene su koncentracije uzoraka DNA (Tablica 1).

Tablica 1. Rezultati određivanja koncentracija uzoraka DNA.

Uzorak	Koncentracija DNA (ng/μL)
HP1	68.47
HP2	187.5
HP3	5.47
HP4	3.37
HP5	2.03
HP6	2.33
HP7	2.77
HP8	220.03
HP9	168.72
HP10	78.2
HP11	57.65
HP12	3.35
HP13	8.9
HP14	7.45
HP15	3
HP16	3.05
HP17	2.35
HP18	42.3
HP19	33.8
HP20	4.25
HP21	19.35

2.4. Umnožavanje gena 23s rRNA, *gyrA* i *gyrB* metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

Provedena je metoda PCR kako bi se detektirala rezistencija na klaritromicin u genu 23s rRNA i rezistencija na levofloksacin u genima *gyrA* i *gyrB*. U tablici 2. prikazan je slijed nukleotida početnica korištenih prilikom umnožavanja navedenih gena metodom PCR.

Tablica 2. Slijed nukleotida početnica korištenih prilikom umnožavanja gena 23s rRNA, *gyrA* i *gyrB* metodom PCR (izvor: Noguchi N. i sur., 2007)

Gen	Početnica	Slijed nukleotida
23s rRNA	Hp23S 1942F	5' - AGGATGCGTCAGTCGCAAGAT - 3'
	Hp23S 2308R	5' - CCTGTGGATAACACAGGCCAGT - 3'
<i>gyrA</i>	gyr APF	5' - AGCTTATTCCATGAGCGTGA - 3'
	gyr APR	5' - TCAGGCCCTTTGACAAATTC - 3'
<i>gyrB</i>	gyr BPF	5' - CCCTAACGAAGCCAAAATCA - 3'
	gyr BPR	5' - GGGCGCAAATAACGATAGAA - 3'

Na temelju koncentracija izoliranih uzoraka DNA pripremljene su tri PCR reakcijske smjese za umnožavanje gena 23s rRNA i tri PCR reakcijske smjese za umnožavanje gena *gyrA* i *gyrB*. U prethodno označene tubice dodaju se sastojci za PCR reakcijsku smjesu po uzoru na tablicu 3.

Tablica 3. Sastojci za PCR reakcijsku smjesu

Sastojak (početna koncentracija)	Konačna koncentracija	Volumen (μL)
PCR pufer (10 x)	1 x	3
dNTP (2mM)	0,2 mM	3
Albumin goveđeg seruma (engl. <i>Bovine serum albumin</i>) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,3
Početnica 1 (Hp23S 1942F) (10 μM)	0,5 μM	1,5
Početnica 2 (Hp23S 2308R) (10 μM)	0,5 μM	1,5
Taq polimeraza (1 U/ μL)	0,02 U/ μL	0,2
DNA uzorak (25 ng/ μL)	-	*
Sterilna destilirana voda	-	19,5
Ukupni volumen (μL)		30

* Volumen uzorka DNA ovisi o koncentraciji izolirane DNA.

Uvjeti reakcije PCR za gene 23s rRNA, *gyrA* i *gyrB* navedeni su u tablicama 4. i 5.

Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za gen 23s rRNA (izvor: Rimbara E. i sur., 2013)²⁶

Korak		Broj ponavljanja		Temperatura (°C)		Trajanje (min)	
Početna denaturacija		1		95		2	
Umnožavanje fragmenata	Denaturacija	5	30	94	94	0,5	0,25
	Sparivanje početnica s kalupom			60	60	0,5	0,25
	Produživanje početnica			72	72	0,5	0,33
Završno produživanje		1		72		7,0	
Čuvanje uzorka		-		-20 °C		neograničeno	

Tablica 5. Uvjeti reakcije PCR za gene *gyrA* i *gyrB* (izvor: Wani F.A. i sur., 2018)²⁷

Korak		Broj ponavljanja		Temperatura (°C)		Trajanje (min)	
Početna denaturacija		1		94		5	
Umnožavanje fragmenata	Denaturacija	35		94		1	
	Sparivanje početnica s kalupom			53		1	
	Produživanje početnica			72		1	
Završno produživanje		1		72		10	
Čuvanje uzorka		-		-20 °C		neograničeno	

2.5. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Kako bi vizualizirali PCR produkte potrebno ih je nanijeti na agarozni gel.

Postupak:

1. Priprema 1 % agaroznog gela: za pripremu 160 mL 1 % agaroznog gela otopi se 1,6 g agaroze u 160 mL 1x Tris-acetatnog pufera (1xTAE pufera). Agaroz se rastopi u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon što se gel ohladi na oko 50-60 °C, dodaje se 6 µL fluorescentne boje (engl. *SYBR safe DNA gel stain*). Fluorescentna boja omogućuje vizualizaciju DNA molekula pod UV-svjetlom. Pripremljeni gel izlije se u kalup za izlivanje gela na kojem je postavljen češalj za formiranje jažica. Nakon što se gel skrutne izvadi se češalj za formiranje jažica, kalup s gelom postavi se u kadicu za elektroforezu i u potpunosti prekrije s 1x TAE puferom.
2. Priprema uzoraka za nanošenje na gel: 30 µL DNA uzorka pomiješa se sa 6 µL boje za nanošenje uzorka na gel.
3. Nanošenje uzoraka na gel: uzorci se nanose u formirane jažice mikropipetom. U prvu jažicu nanosi se standard s fragmentima DNA poznate duljine prema kojem je moguće odrediti veličinu željenih fragmenata.
4. Elektroforeza: elektrode se spoje tako da uzorci putuju od negativnog pola prema pozitivnom polu jer je molekula DNA negativno nabijena. Uključi se izvor napona struje od 150 V i elektroforeza se provodi 30 minuta. Nakon završene elektroforeze primjenom UV-transluminatora provjerena je uspješnost umnožavanja DNA fragmenata.

2.6. Pročišćavanje molekula DNA iz fragmenta gela agaroze

Pročišćavanje fragmenata provedeno je koristeći kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) i pripadajući protokol²⁸.

Postupak:

1. Otapanje agaroznog gela: na UV - transluminatoru uporabom skalpela željeni fragmenti se izdvajaju od ostatka gela. Izdvojeni fragmenti ubace se u prethodno izvaganu tubicu. Tubica sa sadržajem ponovno se važe kako bi se dobio podatak o masi agaroznog fragmenta. Podatak o masi je nužan radi određivanja volumena pufera za otapanje agaroze. U tubice se dodaje pufer za otapanje agaroze (engl. *Membrane Binding Solution*) u omjeru 10 μ L pufera na 10 mg agaroznog fragmenta. Sadržaj tubica inkubira se 10 minuta na 60 °C uz povremeno miješanje na vorteksu kako bi se gel što bolje otopio. Tubice se centrifugiraju tri sekunde kako bi se sadržaj spustio na dno tubice.

2. Vezivanje DNA na kolonu: kolona (engl. *SV Minicolumn*) se postavlja u kolekcijsku tubu i smjesa koja sadrži rastopljeni agarozni gel prenosi se u kolonu. Sadržaj se inkubira jednu minutu na sobnoj temperaturi. Centrifugira se jednu minutu pri 14 000 okretaja i odbacuje tekući sadržaj iz kolekcijske tube.

3. Ispiranje kolone: u kolonu se dodaje 700 μ L pufera za ispiranje (engl. *Membrane Wash Solution*) koji je prethodno razrijeđen sa 75 mL 95 % etanolom. Centrifugira se jednu minutu pri 14 000 okretaja i odbacuje tekući sadržaj iz kolekcijske tube. U kolonu se dodaje 500 μ L pufera za ispiranje (engl. *Membrane Wash Solution*). Centrifugira se pet minuta pri 14 000 okretaja i odbacuje tekući sadržaj iz kolekcijske tube. Ponovno se centrifugira jednu minutu kako bi se uklonili mogući ostatci etanola.

4. Eluiranje DNA iz kolone: kolona se prebacuje u novu tubicu i dodaje se 50 μ L (engl. *Nuclease-Free Water*). Sadržaj se inkubira jednu minutu na sobnoj temperaturi, centrifugira jednu minutu pri 14 000 okretaja te se odbacuje kolona.

2.7. Sekvenciranje PCR produkata

Detekcija mutacija u genima 23s rRNA, *gyrA* i *gyrB* postignuta je sekvenciranjem PCR produkata. Provedeno je Sanger sekvenciranje za oba lanca molekule DNA u biotehnološkoj tvrtki Macrogen Europe.

Sekvence domene V gena 23s rRNA, gena DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) i gena DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) iz devet izolata bakterije *H. pylori* višestruko su poravnate u alatu ClustalX programa (sučelja) BioEdit^{29,30}. Vizualizacija i daljnja obrada poravnatih sekvenci obavljena je pomoću programa Jalview³¹.

3. REZULTATI

3.1. Određivanje osjetljivosti izolata *H. pylori* na klaritromicin i levofloksacin

Ispitivanje osjetljivosti izolata *H. pylori* na antibiotike klaritromicin i levofloksacin provedeno je prema uvjetima opisanim u poglavlju 2.1. U tablici 6. prikazani su sljedeći podatci: godina kada je uzorak uzet, spol pacijenta, broj uzorka te osjetljivost bakterijskog soja na klaritromicin i levofloksacin.

Tablica 6. Rezultati određivanja osjetljivosti izolata *H. pylori* na klaritromicin i levofloksacin

Godina	Spol	Uzorak	Osjetljivost na klaritromicin	Osjetljivost na levofloksacin
2018	žensko	H15	osjetljiv	nema podataka
2019	muško	H16	osjetljiv	nema podataka
	žensko	H10	rezistentan	osjetljiv
	žensko	H11	rezistentan	osjetljiv
	muško	H12	osjetljiv	osjetljiv
	žensko	H13	osjetljiv	nema podataka
	žensko	H14	osjetljiv	nema podataka
2020	muško	H1	osjetljiv	nema podataka
	žensko	H2	rezistentan	rezistentan
	žensko	H3	rezistentan	rezistentan
	žensko	H4	rezistentan	rezistentan
	muško	H5	rezistentan	rezistentan
	muško	H6	rezistentan	rezistentan
2022	muško	H17	rezistentan	osjetljiv
	žensko	H18	osjetljiv	osjetljiv
	žensko	H19	rezistentan	rezistentan
	žensko	H20	rezistentan	osjetljiv
	žensko	H21	osjetljiv	osjetljiv
	muško	H7	rezistentan	osjetljiv
	žensko	H8	rezistentan	rezistentan
	žensko	H9	osjetljiv	osjetljiv

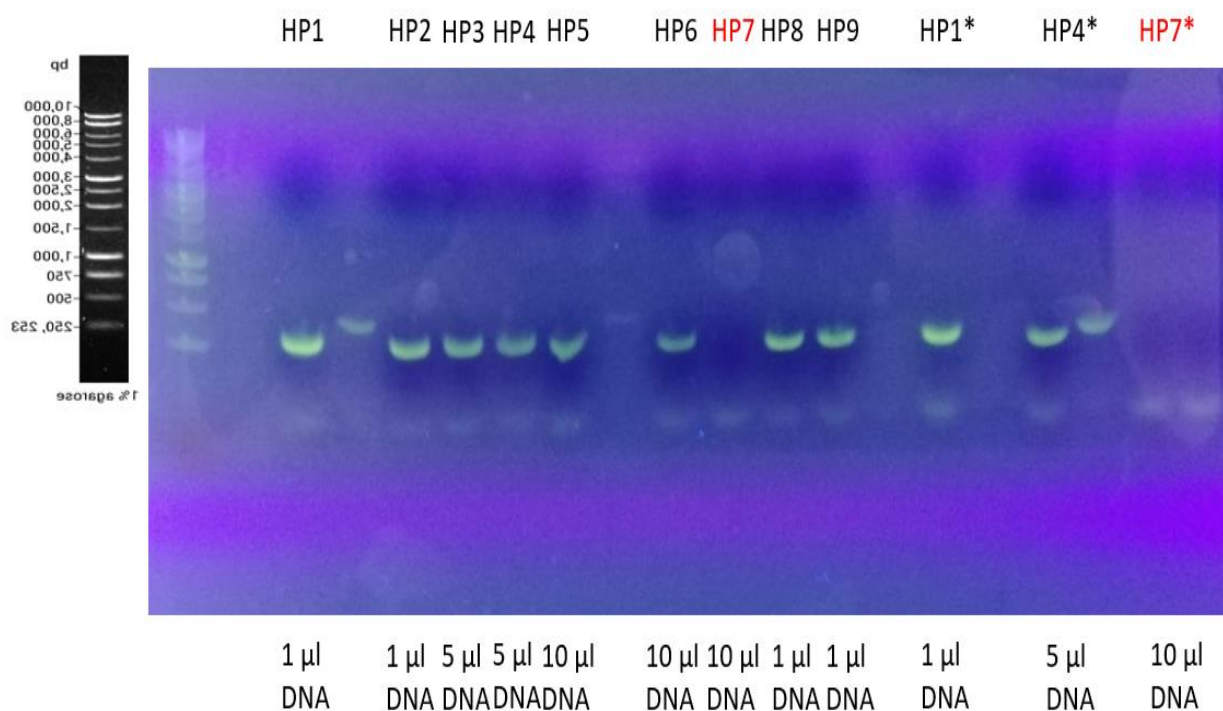
Od dvadeset i jednog izolata, 57,1 % je rezistentno na klaritromicin, a 28,6 % je rezistentno na levofloksacin.

3.2. Detekcija rezistencije na klaritromicin i levofloksacin metodom PCR

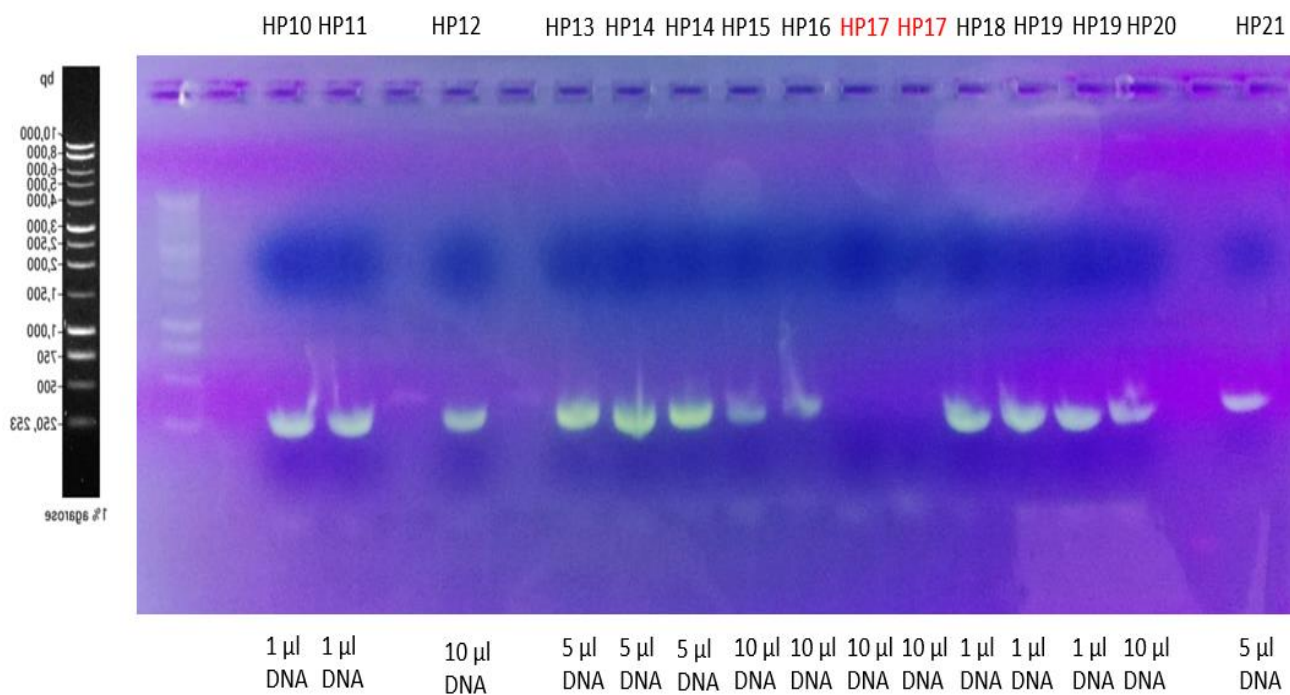
Rezistencija na klaritromicin i levofloksacin određena je metodom PCR. PCR produkti vizualizirani su elektroforezom u agaroznom gelu, a dokaz željenog gena temelji se na prisutnosti signala.

3.2.1. Detekcija gena 23s rRNA

Gen 23s rRNA umnožen je parom početnica Hp23S 1942F i Hp23S 2308R. Prisutnost signala uočena je u 90,5 % uzoraka (Slika 8. i 9.). Uzorci HP7 i HP17 nisu pokazali signal, a mogući uzrok je neuspješno umnožavanje gena zbog niske koncentracije izolirane DNA molekule. Temeljem standarda s fragmentima DNA poznate duljine određene su veličine fragmenta koje iznosi 367 pb.



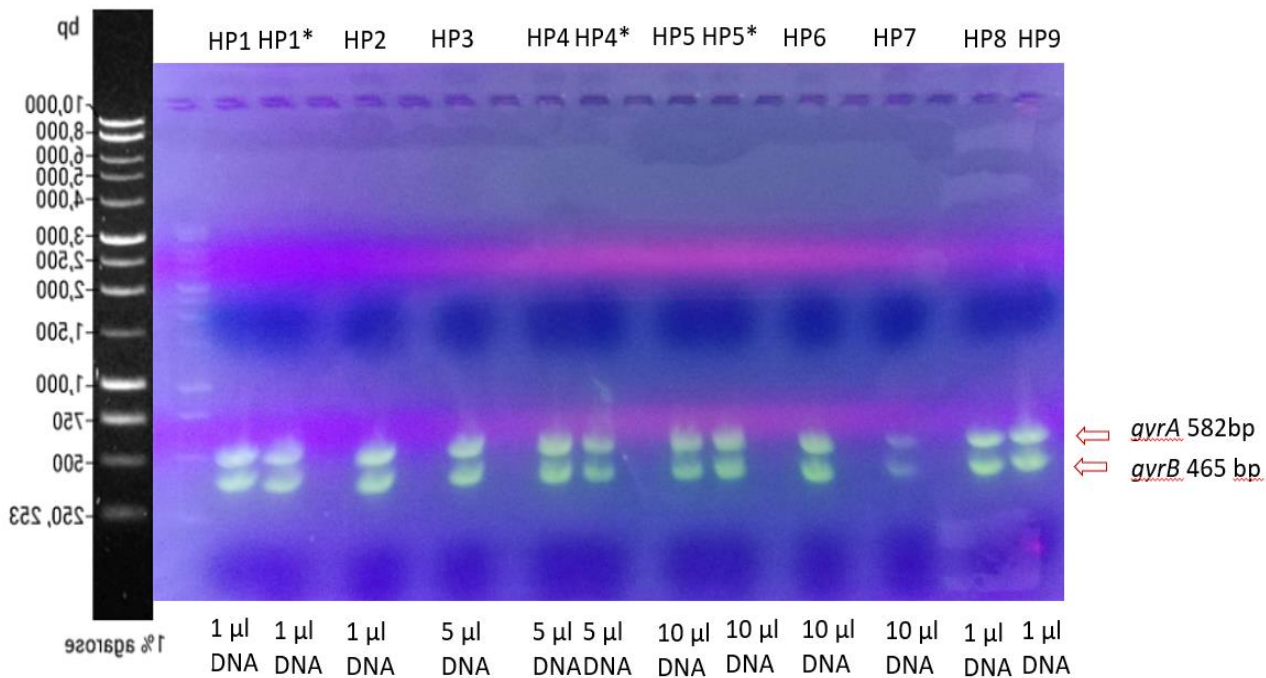
Slika 8. Rezultati umnožavanja gena 23s rRNA na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)



Slika 9. Rezultati umnožavanja gena 23s rRNA na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)

3.2.2. Detekcija gena *gyrA* i *gyrB*

Gen *gyrA* umnožen je parom početnica *gyr* APF i *gyr* APR, a gen *gyrB* početnicama *gyr* BPF i *gyr* BPR. Prisutnost signala uočena je u 100 % uzoraka (Slika 10.). Temeljem standarda s fragmentima DNA poznate duljine određene su veličine gena *gyrA* i *gyrB* koje iznose 582 pb odnosno 465 pb.



Slika 10. Rezultati umnožavanja gena *gyrA* i *gyrB* na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)

3.3. Bioinformatička analiza sekvenci

Sekvence V domene gena 23s rRNA, gena *gyrA* i *gyrB* iz devet izolata bakterije *H. pylori* višestruko su poravnate u alatu ClustalX programa (sučelja) BioEdit. Vizualizacija i daljnja obrada poravnatih sekvenci obavljena je pomoću programa Jalview.

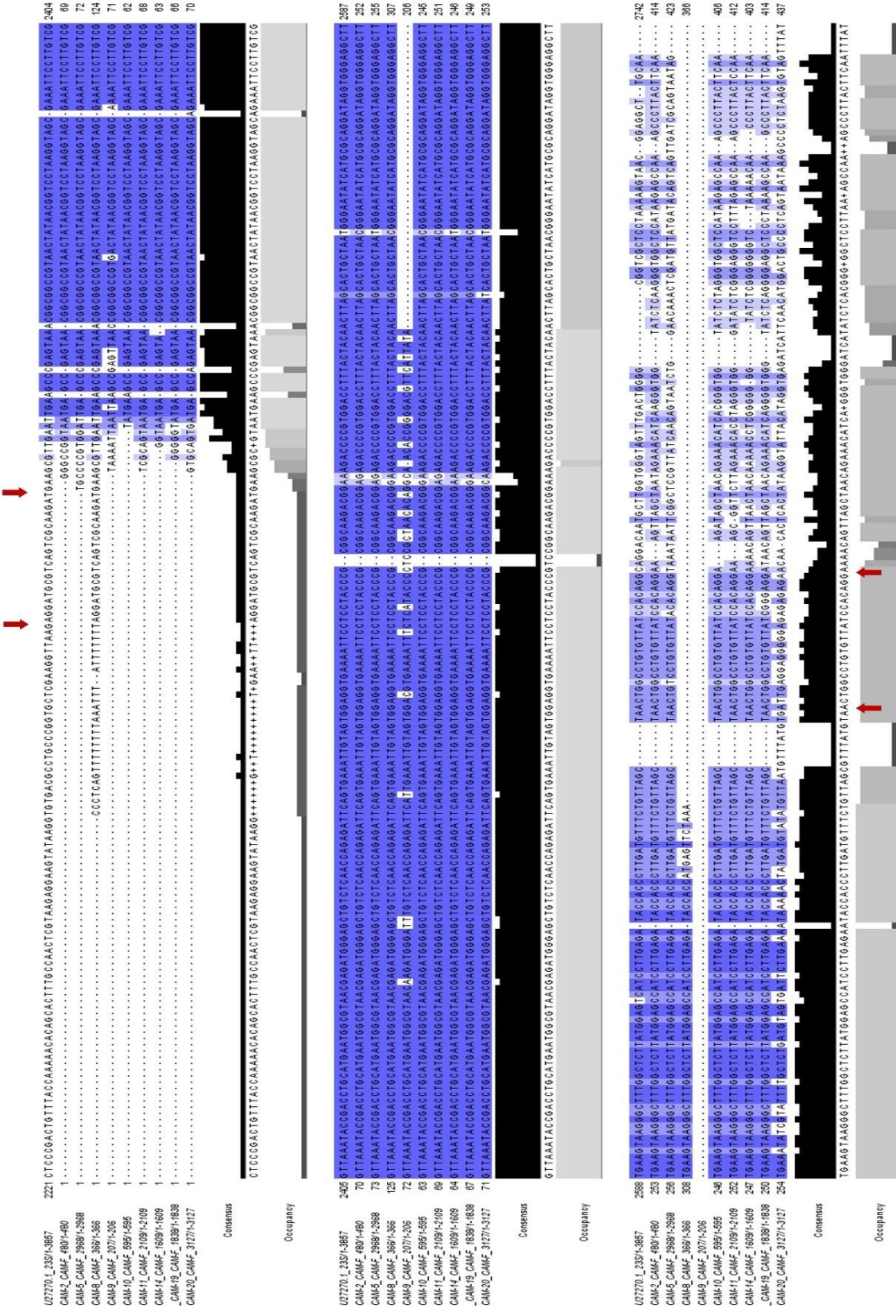
3.3.1. Analiza slijeda nukleotida V domene gena 23s rRNA iz izolata bakterije *H. pylori*

Sekvence V domene gena 23s rRNA uspoređene su sa referentnom sekvencom 23s rRNA (U27270).

Analiziranjem slijeda nukleotida pronađene su mutacije na pozicijama 2514 i 2515 gdje dolazi do tranzicije adenina u gvanin (A2514G i A2515G) i transverzije adenina u citozin (A2514C i A2515C) (Slike 11 i 12). Mutacija A2514G pronađena je u uzorcima HP8, HP9, HP10 i HP19 (44,4 %), a mutacija A2514C u uzorku HP20 (11,11 %). Mutacija A2515G pronađena je u uzorcima HP2, HP5 i HP11 (33,33 %), a mutacija A2515C u uzorku HP9 (11,11 %).

Daljnje mutacije pronađene su na pozicijama 2554 i 2616 gdje dolazi do tranzicije timina u citozin (T2554C i T2616C). Mutacija T2554C uočena je u uzorcima HP2, HP8, HP10, HP11 i HP19 (55,55 %), a mutacija T2616C u uzorcima HP2, HP5, HP8, HP10, HP11 i HP14 (66,66 %).

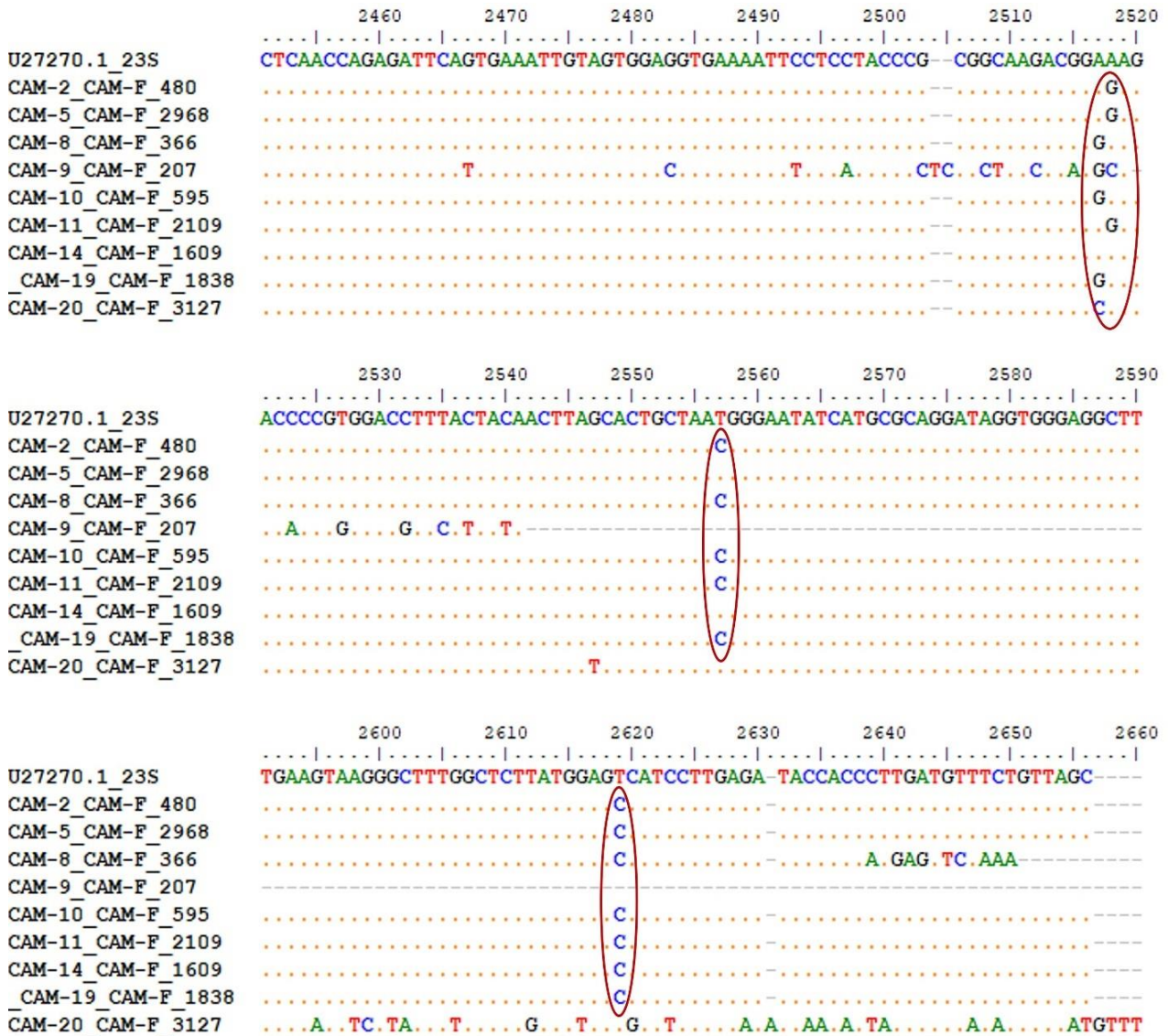
Hp23S 1942F 5' - AGGATGGCTCACTGCCAAGAT - 3'



Hp23S 2308F 2' - CAGGCGGATGTCGCGCCGCTG - 3'



Slika 11. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci V domene gena 23s rRNA izolata bakterije *H. pylori*.



Slika 12. Prikaz nukleotidnih sekvenci V domene gena 23s rRNA izolata bakterije *H. pylori* s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (U27270, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/881379/?report=genbank>). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. Gledajući redom od gore prema dolje mutacije označene crvenim krugovima su sljedeće: A2514G, A2514C, A2515G, A2515C, T2554C i T2616C.

Tablica 7. Usporedba rezultata antibiograma sa rezultatima analize sekvenci V domene gena 23s rRNA.

Uzorak	Osjetljivost na klaritromicin	Vrsta mutacije
HP2	rezistentan	A2515G, T2554C, T2616C
HP5	rezistentan	A2515G, T2616C
HP8	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C
HP9	osjetljiv	A2514G, A2515C
HP10	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C
HP11	rezistentan	A2515G, T2554C, T2616C
HP14	osjetljiv	T2616C
HP19	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C
HP20	rezistentan	A2514C

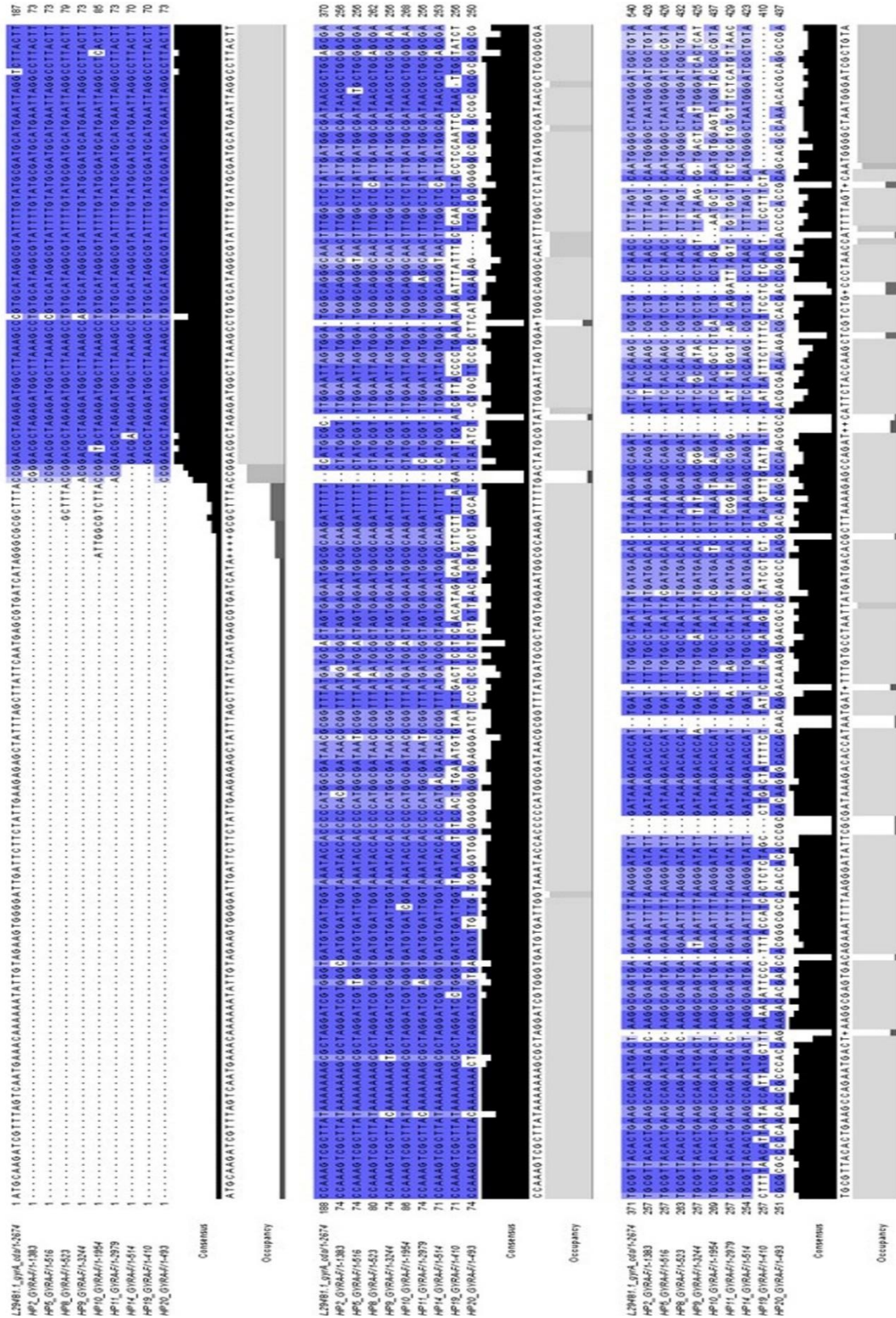
Ispitivanjem osjetljivosti izolata *H. pylori* na klaritromicin utvrđeno je kako su uzorci HP9 i HP14 osjetljivi na navedeni antibiotik, međutim bioinformatičkom analizom pronađene su mutacije A2514G i A2515C u uzorku HP9, odnosno mutacija T2616C u uzorku HP14 (Tablica 7).

3.3.2. Analiza slijeda nukleotida gena DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) izolata bakterije *H. pylori*

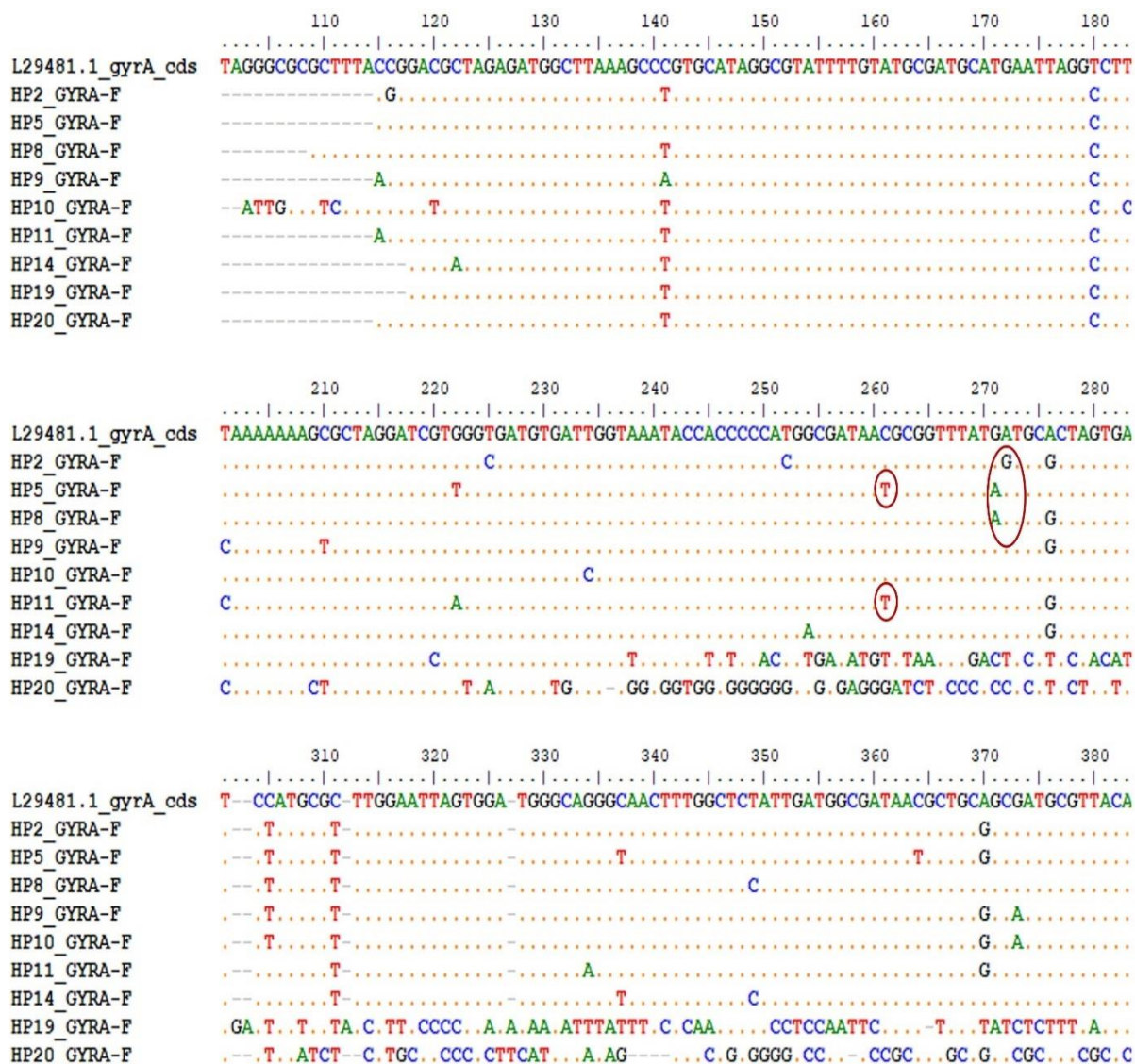
Analiziranjem slijeda nukleotida gena *gyrA* uočena je mutacija na položaju 261 (C261T) gdje se odvila tranzicija citozina u timin (Slike 13 i 14). Mutacija je pronađena u uzorcima HP5 i HP11 (22,22 %).

Na položaju 271 pronađena je mutacija G271A (tranzicija gvanina u adenin) i prisutna je u uzorcima HP5 i HP8 (22,22 %).

Nadalje, na sljedećem položaju 272 nalazi se mutacija A272G (tranzicija adenina u gvanin) i pronađena je u uzorku HP2 (11,11 %).



Slika 13. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) izolata bakterije *H. pylori*. Sekvence izolata *H. pylori* uspoređene su sa kodirajućom sekvencom gena DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) (L29481, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/L29481>).



Slika 14. Prikaz nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) izolata bakterije *H. pylori* s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (L29481). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugovima su sljedeće: C261T, G271A i A272G.

Analizom aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) uočene su promjene u aminokiselinskom slijedu nastale kao posljedice pogrešnih mutacija u nukleotidnom slijedu (Slike 15 i 16).

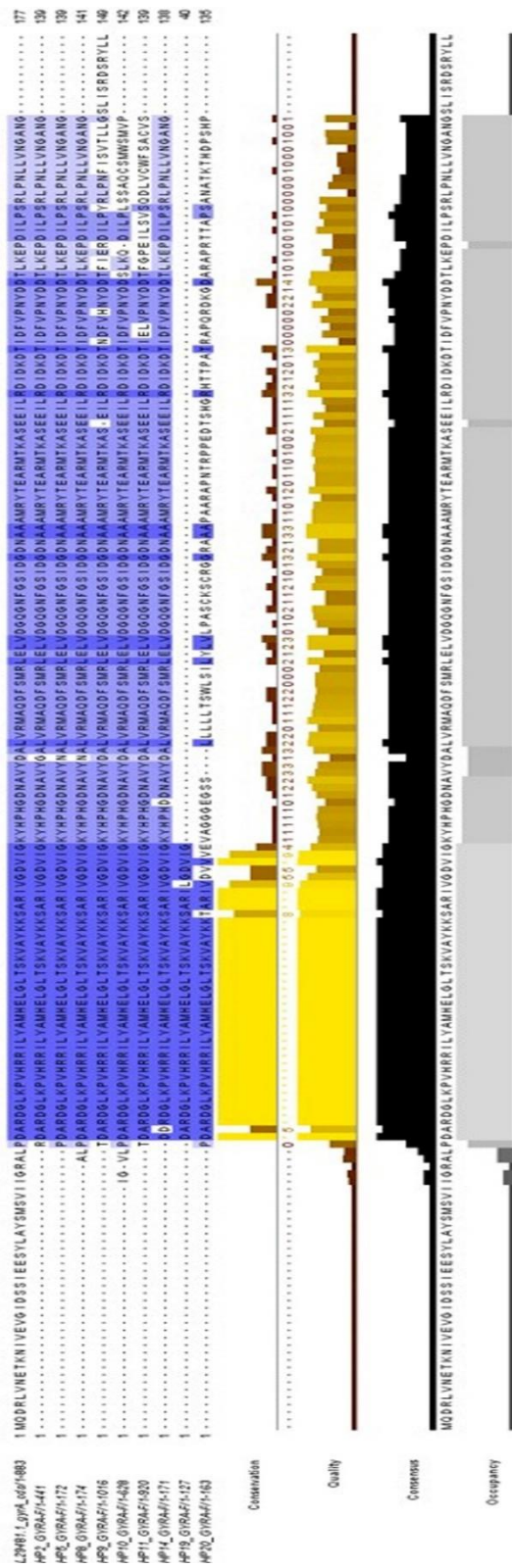
Prema referentnoj sekvenci kodon AAC prevodi se u aminokiselinu asparagin (N). U sekvencama uzoraka HP5 i HP11 uočena je promjena kodona AAC u AAT zbog mutacije C261T (Tablica 8). Unatoč mutaciji slijed AAT kodira istu aminokiselinu tj. asparagin (N). Iz navedenog zaključuje se da je mutacija C261T istosmisljena ili tiha mutacija (engl. *silent mutation*).

U referentnoj sekvenci triplet GAT kodira asparaginsku kiselinu (D). U uzorcima HP5 i HP8 mutacija G271A uzrokuje promjenu tripleta GAT u AAT što rezultira supstitucijom asparaginske kiseline (D) s asparaginom (N). Navedena supstitucija označava se kao D91N jer je u aminokiselinskoj sekvenci pronađena na položaju 91 (Tablica 8).

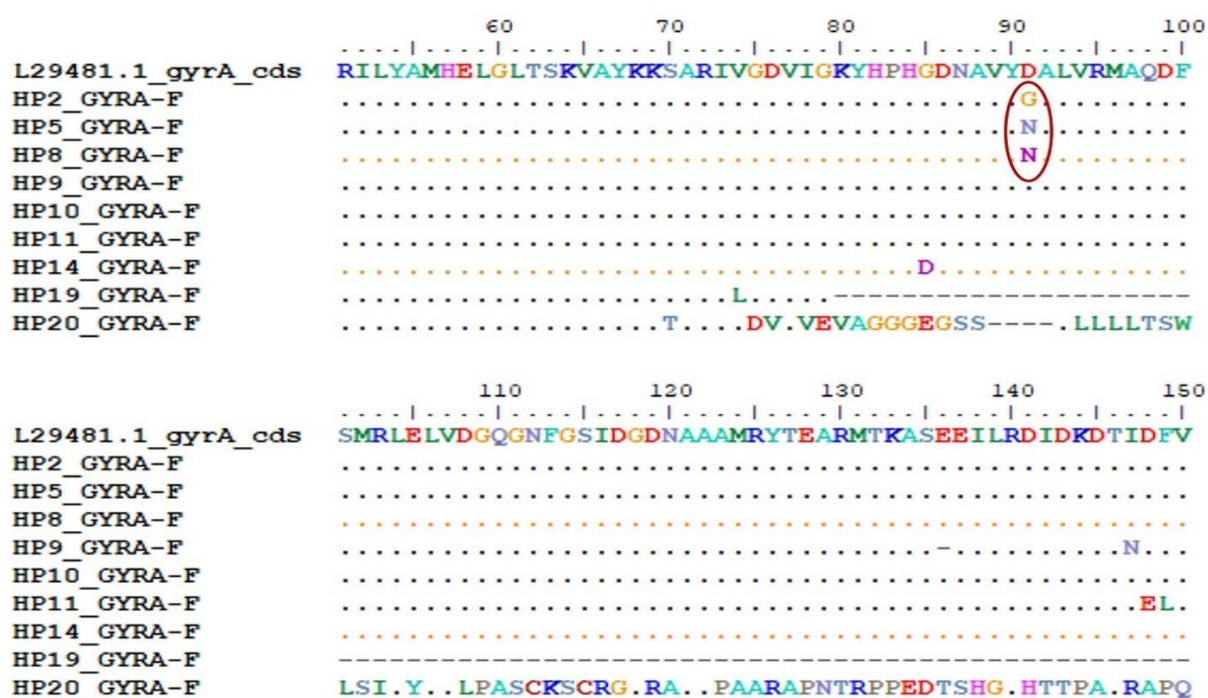
Nadalje, prethodno navedeni triplet u HP2 uzorku promijenjen je u GGT zbog mutacije A272G. Promjena tripleta uzrokuje supstituciju asparaginske kiseline (D) s glicinom (G) i označava se kao D91G.

Tablica 8. Povezanost baznih supstitucija sa supstitucijama aminokiselina.

Uzorak	Bazna supstitucija	Supstitucija aminokiseline	Oznaka mutacije
HP5, HP11	AAC → AAT	-	-
HP5, HP8	G AT → A AT	D → N	D91N
HP2	G A T → G G T	D → G	D91G



Slika 15. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) izolata bakterije *H. pylori*.

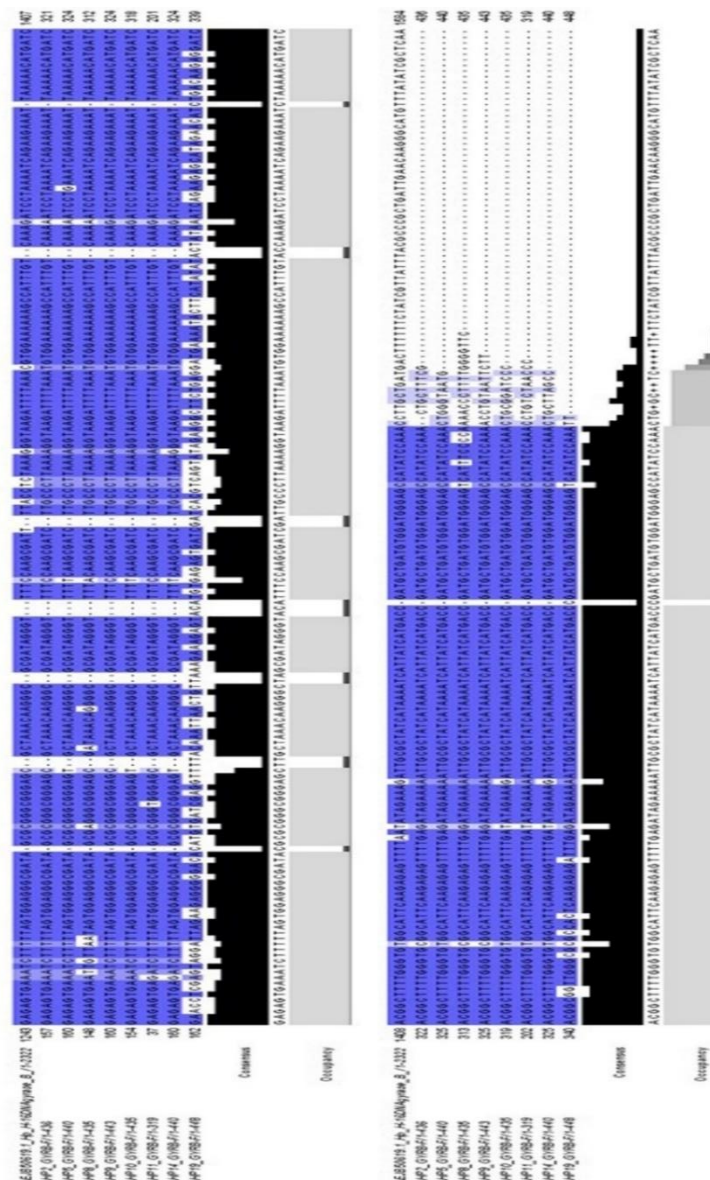


Slika 16. Prikaz aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (*gyrA*) izolata bakterije *H. pylori* s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda aminokiselina u odnosu na referentnu sekvencu (L29481). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U prvom redu gledajući od gore prema dolje mutacije označene crvenim krugom su sljedeće: D91G i D91N.

3.3.3. Analiza slijeda nukleotida gena DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori*

Proučavanjem slijeda nukleotida gena *gyrB* mapirana je mutacija A1441G na položaju 1441 (Slike 17 i 18). Uzrok mutacije je tranzicija adenina u gvanin i pronađena je u svim uzorcima (100%).

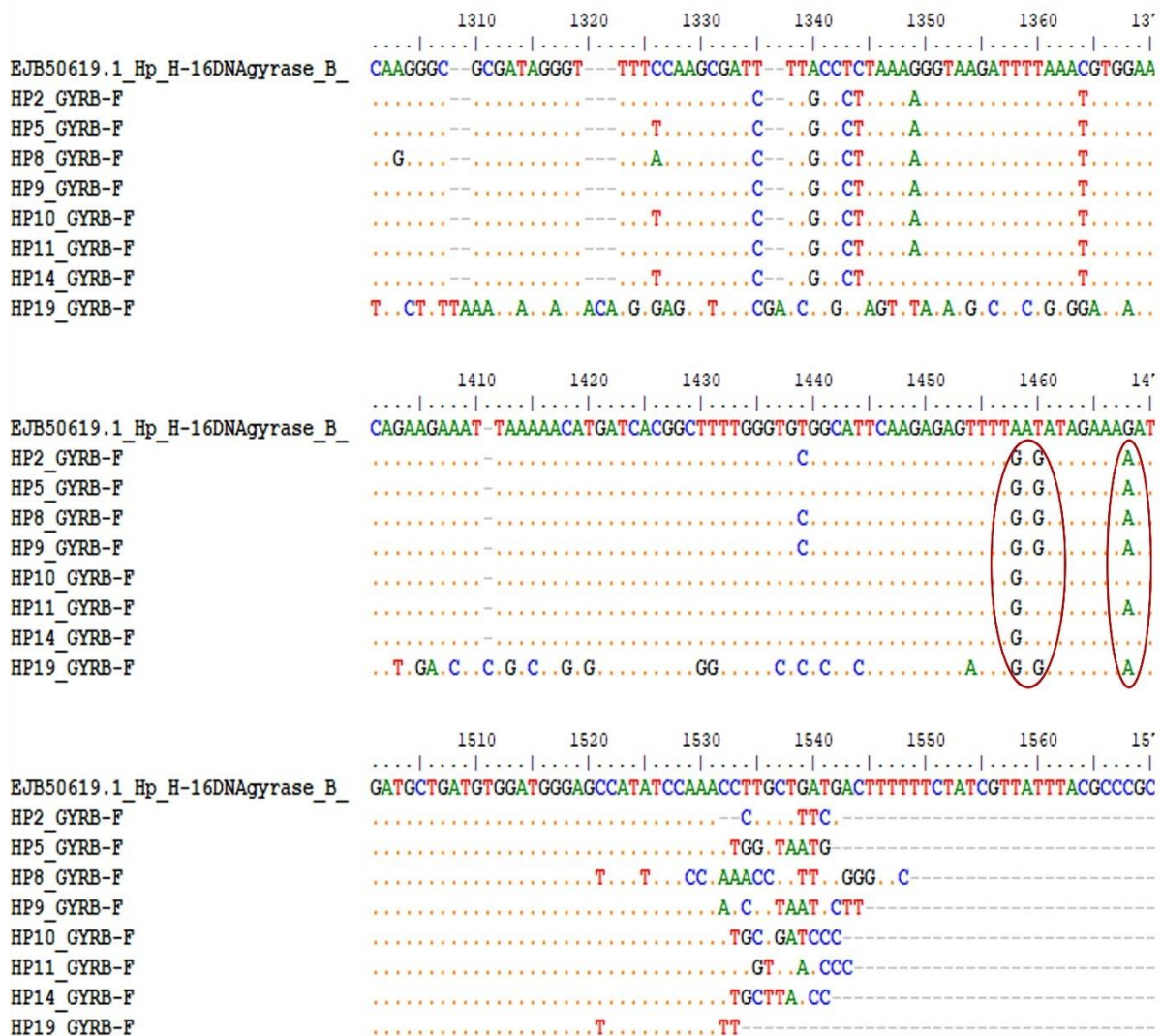
Na položaju 1443 nalazi se mutacija T1443G čiji uzrok je transverzija timina u gvanin. Otkrivena je u uzorcima HP2, HP5, HP8, HP9 i HP19 (62,5 %).



Slika 17. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori*. Sekvence izolata *H. pylori* uspoređene su sa kodirajućom sekvencom gena DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) (EJB50619,

<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/api/fasta/EJB50619.1?lineLimit=1000>).

Nadalje, uočena je mutacija G1451A (tranzicija gvanina u adenin) na poziciji 1451 koja je pronađena u uzorcima HP2, HP5, HP8, HP9, HP11 i HP19 (75 %).



Slika 18. Prikaz nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori* s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (EJB50619). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugovima jesu sljedeće: A1441G, T1443G i G1451A.

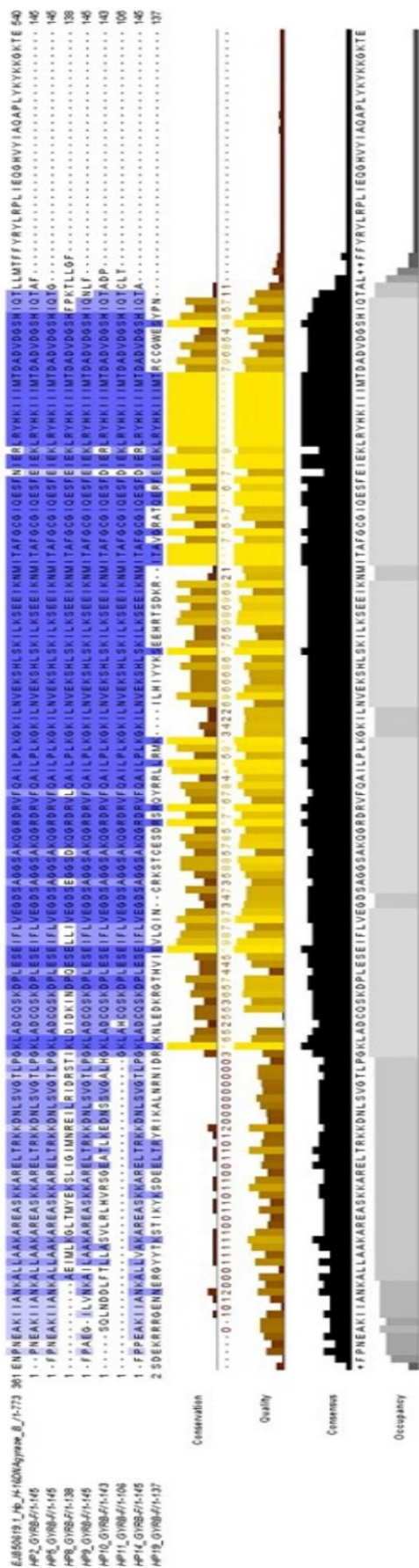
U aminokiselinskim sekvencama identificirane su supstitucije aminokiselina čiji uzrok su pogrešne mutacije nastale u nukleotidnom slijedu (Slike 19 i 20.). Primjerice, kodon AAT prevodi se u aminokiselinu asparagin (N), no u HP2, HP5, HP8 i HP9 uzorcima mutacije A1441G i T1443G uzrokuju njegovu promjenu u kodon GAG (Tablica 9). Posljedica opisane

promjene je supstitucija asparagina (N) s glutaminskom kiselinom (E). Navedena supstitucija označava se s N481E jer je pronađena u aminokiselinskom slijedu na položaju 481 (Tablica 9). Nadalje, uzorci HP10, HP11 i HP14 sadrže mutaciju A1441G koja uvjetuje promjenu istog kodona (AAT) u novi kodon GAT. Novonastali kodon prevodi se u asparaginsku kiselinu (D), a mutacija se označava kao N481D (Tablica 9).

Prema referentnoj sekvenci triplet AGA kodira aminokiselinu arginin (R), međutim mutacija G1451A uzrokuje njegovu promjenu u AAA što rezultira zamjenom arginina (R) s lizinom (K). Mutacija se definira kao R484K (Tablica 9).

Tablica 9. Povezanost baznih supstitucija sa supstitucijama aminokiselina.

Uzorak	Bazna supstitucija	Supstitucija aminokiseline	Oznaka mutacije
HP2, HP5, HP8, HP9, HP19	AA T → GA G	N → E	N481E
HP10, HP11, HP14	A AT → G AT	N → D	N481D
HP2, HP5, HP8, HP9, HP19, HP11, HP19	A G A → AA A	R → K	R484K



Slika 19. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori*.



Slika 20. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (*gyrB*) izolata bakterije *H. pylori* s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda aminokiselina u odnosu na referentnu sekvencu (EJB50619). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugom jesu: N481E, N481D i N484K.

Tablica 10. Usporedba rezultata antibiograma sa rezultatima analize sekvenci podjedinica A (*gyrA*) i B (*gyrB*) DNA giraze

Uzorak	Osjetljivost na levofloksacin	Vrsta mutacije u podjedinici A, DNA giraze (<i>gyrA</i>)	Vrsta mutacije u podjedinici B, DNA giraze (<i>gyrB</i>)
HP2	rezistentan	D91G	N481E, R484K
HP5	rezistentan	D91N	N481E, R484K
HP8	rezistentan	D91N	N481E, R484K
HP9	osjetljiv	nema mutacije	N481E, R484K
HP10	osjetljiv	nema mutacije	N481D
HP11	osjetljiv	nema mutacije	N481D, R484K
HP14	nema podataka	nema mutacije	N481D
HP19	rezistentan	nema mutacije	N481E, R484K
HP20	osjetljiv	nema mutacije	nema mutacije

Ispitivanjem fenotipske osjetljivosti izolata *H. pylori* na levofloksacin utvrđeno je da su uzorci HP2, HP5 i HP8 rezistentni na navedeni antibiotik što je u skladu sa rezultatima bioinformatičke analize (Tablica 10). Uzorak HP19 pokazuje rezistenciju iako ne sadrži mutacije u podjedinici A odgovorne za rezistenciju na levofloksacin, već sadrži mutacije N481E i R484K u podjedinici B.

4. RASPRAVA

U približno 50 % svjetske populacije *H. pylori* kolonizira sluznicu želuca i uzrokuje različite gastrointestinalne bolesti, međutim u znatnom broju zaraženih pojedinaca ne uzrokuje simptome⁹. Liječenje predstavlja izuzetan izazov prvenstveno jer monoterapije ne pokazuju uspjeh, već je prema smjernicama EHSO (engl. *European Helicobacter Study Group*) potrebna kombinacija dvaju antibiotika (klaritromicin, amoksicilin, metronidazol, levofloksacin...) s inhibitorima protonske pumpe i bizmutom¹⁰. Usprkos provedbi kombiniranih terapija, liječenje nije uspješno u 10-30% slučajeva. Mogući uzroci neuspješnog liječenja su kratak period liječenja, preuranjeni prekid liječenja, utjecaj drugih lijekova na terapiju, zdravstveno stanje pacijenta, međutim glavni uzrok je antibiotska rezistencija.

Tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je značajan porast rezistencije *H. pylori* na mnoge antibiotike koji su trenutno jedini oblik terapije korišten u liječenju infekcije. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization – WHO*) svrstava *H. pylori* na listu patogena koji zbog razvijene antibiotske rezistencije zahtijevaju proizvodnju novog antibiotika. Prema objavljenim podacima pripada kategoriji visokog prioriteta zbog rezistencije na klaritromicin. Rješenje globalnog problema moguće je postići otkrićem novog antibiotika ili efikasnog cjepiva te daljnjim istraživanjima nastanka i širenja rezistencije.

Prema svemu navedenom, cilj diplomskog rada je bila molekularna karakterizacija ili analiza sekvenci triju gena čije mutacije su povezane sa rezistencijom na antibiotike klaritromicin i levofloksacin.

Analizom sekvence gena 23s rRNA najčešće uočene mutacije jesu na pozicijama 2514 i 2515 gdje dolazi do tranzicije adenina u gvanin (A2514G i A2515G) i transverzije adenina u citozin (A2514C i A2515C). Godine 2021. u Sudanu Albasha M.A. i sur. realizirali su istraživanje čiji je cilj bio odrediti rezistenciju *H. pylori* na klaritromicin¹¹. Proveli su metodu PCR koristeći uzorke DNA izolirane iz bioptata želučane sluznice. Sekvenciranjem PCR produkata dokazali su mutacije A2142G i A2143G koje se podudaraju sa mutacijama A2514G i A2515G pronađenim u ovom istraživanju. Marques T.A. i sur. (2020) tijekom istraživanja provedenom u Portugalu upotrijebili su uzorke DNA izolirane iz bioptata želučane sluznice te su mutacije povezane sa rezistencijom na klaritromicin dokazali metodom NGS (engl. *Next generation sequencing*). U 16,7 % izolata pronašli su mutaciju A2142C koja se prema analizi sekvence gena 23s rRNA podudara s mutacijom A2514C. Također, Osaki T. i sur. (2017) u sklopu istraživanja u Japanu dokazali su rezistenciju na klaritromicin metodom PCR koristeći uzorke DNA izolirane iz fecesa te izolata *H. pylori*³². Uočili su mutaciju A2143C što je ujedno i mutacija A2515C pronađena u ovom istraživanju. Navedene mutacije nalaze se u peptidil

transferaznoj petlji unutar domene V. U ovom istraživanju mutacije odgovorne za rezistenciju *H. pylori* na klaritromicin jesu A2514C, A2514G i A2515G, no A2514G je prisutna u jednom osjetljivom soju u kombinaciji s mutacijom A2515C. Osaki T. i sur. navode da je mutacija A2515C/A2143C povezana sa rezistencijom na klaritromicin, međutim u ovom istraživanju pronađena je samo u osjetljivom soju.

Nadalje, uočene su dodatne mutacije na položajima 2554 i 2616 (T2554C i T2616C). Prema Marques T.A. i sur. (2020) mutacije T2554C i T2616C odgovaraju prvotnim opisanim mutacijama T2182C, odnosno T2244C¹². Istoimeni autori smatraju da mutacija T2182C nije povezana s rezistencijom na klaritromicin jer je pronađena u osjetljivim sojevima. Suprotno mišljenje iskazali su Kim. S.K. i sur. (2002) te Khan R. i sur. (2004) u svojim radovima potvrdivši povezanost mutacije T2182C sa rezistencijom na klaritromicin^{33,34}. Kim. S.K. i sur. (2002) organizirali su ispitivanje u Južnoj Koreji i pomoću metode PCR-RFLP mapirali su mutaciju T2182C u rezistentnim sojevima. Isto tako, u Bangladešu Khan R. i sur. (2004) metodom PCR i sekvenciranjem PCR produkata dokazali su prisutnost mutacije T2182C u rezistentnim sojevima. Rezultati njihovih radova podudaraju se sa rezultatima ovog istraživanja jer T2554C/T2182C nije pronađena u osjetljivim sojevima, no dokazana je u 55,55% rezistentnih sojeva. Nadalje, utjecaj mutacije T2616C/T2244C na razvoj rezistencije nije u potpunosti istražen, međutim analizom rezultata pronađena je u 66,66% rezistentnih sojeva te u jednom osjetljivom soju (11,11%).

Sve prethodno navedene mutacije odgovaraju prvotno opisanim mutacijama, međutim uzrok različitim položajima jest usporedba sekvenci s dužom referentnom sekvencom U27270.

Proučavanjem aminokiselinskih sekvenci podjedinice A (*gyrA*) DNA giraze detektirane su supstitucije aminokiselina u QRDR regiji smještenoj između 67 i 106 aminokiseline. Godine 2020. u Kini Zhang Y. i sur. su proveli istraživanje čiji cilj je bio dokazati rezistenciju na levofloksacin kod izolata *H. pylori* izoliranih iz sluznice želuca kod djece²⁰. Dokazali su mutaciju D91N koja prema analizi sekvence podjedinice A (*gyrA*) DNA giraze odgovara pronađenoj mutaciji na položaju 91 (D91N). Iste godine u Pekingu Lok i sur. koristeći izolate *H. pylori* izolirane iz sluznice želuca, metodu PCR i sekvenciranjem istih identificirali su mutaciju D91G što je ujedno i mutacija D91G pronađena u ovom istraživanju³⁵. Mutacije D91N i D91G povezane su sa rezistencijom *H. pylori* na levofloksacin. Također, supstitucija aminokiseline asparagin (N) na položaju 87 u QRDR regiji odgovorna je za rezistenciju na levofloksacin, međutim u ovom istraživanju nije utvrđena prisutnost u uzorcima.

Analizom aminokiselinskih sekvenci podjedinice B (*gyrB*) DNA giraze nisu pronađene mutacije povezane sa rezistencijom na levofloksacin. Rezistencija *H. pylori* na levofloksacin

primarno nastaje zbog mutacija u *gyrA* genu, dok su rijetke mutacije u *gyrB* genu popraćene s mutacijama u *gyrA* genu. U aminokiselinskim sekvencama pronađene su mutacije N481E, N481D i R484K. Jedino uzorak HP19 pokazuje rezistenciju na levofloksacin iako ne sadrži mutacije u podjedinici A, već sadrži mutacije N481E i R484K u podjedinici B. Zbog svega navedenog postoji mogućnost povezanosti mutacija N481E i R484K sa rezistencijom na levofloksacin. U dosadašnjim znanstvenim istraživanjima mutacije N481E, N481D i R484K nisu identificirane te njihovu ulogu u rezistenciji na levofloksacin potrebno je dodatno istražiti. Tijekom istraživanja uočena je višestruka rezistencija, odnosno istovremena rezistencija na klaritromicin i levofloksacin koji pripadaju različitim skupinama antibiotika. Prema podacima iz tablice 11. uzorci HP2, HP5, HP8 i HP19 pokazuju rezistenciju na oba antibiotika što je u skladu s identificiranim mutacijama u sekvencama triju gena. Slične podatke pokazalo je istraživanje Lok i sur. (2020) u kojem su u 22 uzorka od ukupno 112 uzoraka dokazali istovremenu rezistenciju na klaritromicin i levofloksacin³⁵. Višestruka rezistencija na oba antibiotika predstavlja prepreku u liječenju infekcije jer je klaritromicin dio „prve linije obrane“, a levofloksacin pripada posljednjim oblicima alternativnih terapija što posljedično znatno smanjuje broj mogućih terapija.

Tablica 11. Višestruka rezistencija na klaritromicin i levofloksacin kod izolata bakterije *H. pylori*

Uzorak	Osjetljivost na klaritromicin	Vrsta mutacije u 23s rRNA genu	Osjetljivost na levofloksacin	Vrsta mutacije u podjedinici A, DNA giraze (<i>gyrA</i>)	Vrsta mutacije u podjedinici B, DNA giraze (<i>gyrB</i>)
HP2	rezistentan	A2515G, T2554C, T2616C	rezistentan	D91G	N481E, R484K
HP5	rezistentan	A2515G, T2616C	rezistentan	D91N	N481E, R484K
HP8	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C	rezistentan	D91N	N481E, R484K
HP9	osjetljiv	A2514G, A2515C	osjetljiv	nema mutacije	N481E, R484K
HP10	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C	osjetljiv	nema mutacije	N481D
HP11	rezistentan	A2515G, T2554C, T2616C	osjetljiv	nema mutacije	N481D, R484K
HP14	osjetljiv	T2616C	nema podataka	nema mutacije	N481D
HP19	rezistentan	A2514G, T2554C, T2616C	rezistentan	nema mutacije	N481E, R484K
HP20	rezistentan	A2514C	osjetljiv	nema mutacije	nema mutacije

5. ZAKLJUČAK

Prema provedenom istraživanju i dostupnoj literaturi, navodim sljedeće zaključke:

1. Ispitivanjem fenotipske osjetljivosti izolata *H. pylori* metodom E – testa u njih 57,1 % utvrđena je rezistencija na klaritromicin, a u 28,6 % rezistencija na levofloksacin.
2. Metodom PCR u 90,5 % uzoraka uspješno je umnožen fragment V domene gena 23s rRNA veličine 367 pb u kojima je sekvenciranjem DNA utvrđeno postojanje mutacija povezanih sa rezistencijom na klaritromicin. Fragmenti gena *gyrA* i *gyrB* odgovorni za rezistenciju na levofloksacin umnoženi su u svim uzorcima, a veličina PCR produkata iznosi 582 pb, odnosno 465 pb.
3. U devet izolata bakterije *H. pylori* prema bioinformatičkoj analizi sekvenci V domene gena 23s rRNA mutacije odgovorne za rezistenciju na klaritromicin jesu A2514C, A2514G i A2515G. Mutacija A2515C pronađena je samo u osjetljivom uzorku što je pokazatelj da nije odgovorna za rezistenciju na klaritromicin. Također, u 55,55 % rezistentnih sojeva detektirana je mutacija T2554C što ukazuje na njenu povezanost sa rezistencijom. Isto tako mogući utjecaj na rezistenciju pokazuje mutacija T2616C jer je pronađena u 66,66% rezistentnih sojeva te u jednom osjetljivom soju.
4. U aminokiselinskim sekvencama podjedinice A (*gyrA*) DNA giraze detektirane su mutacije D91G i D91N u 33,33 % rezistentnih sojeva. Shodno tome potvrđena je njihova uloga u rezistenciji na levofloksacin.
5. Analiza aminokiselinskih sekvenci podjedinice B (*gyrB*) DNA giraze nije pokazala mutacije povezane sa rezistencijom na levofloksacin. Navedeni podatak je u skladu sa znanstvenim činjenicama kako su mutacije u genu *gyrA* primarno odgovorne za rezistenciju na levofloksacin. Pronađene su mutacije N481E i R484K, no njihovu ulogu u rezistenciji potrebno je dodatno istražiti.
6. Četiri uzorka pokazuju višestruku rezistenciju, odnosno istovremenu rezistenciju na klaritromicin i levofloksacin. Višestruka rezistencija predstavlja ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju jer znatno smanjuje broj mogućih i djelotvornih terapija.

S obzirom na sve navedene zaključke, *H. pylori* je patogena bakterija koja zbilja uspješno razvija otpornost na antibiotike i unatoč poduzetim koracima prilikom liječenja predstavlja opasnost ljudskom zdravlju te zahtijeva proizvodnju novog učinkovitog antibiotika.

6. METODIČKI DIO

Ime i prezime učitelja	Predmet	Razred
Blanka Dadić	Biologija	3
Nastavna tema <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikulumuma (GIK).</i>		Datum
Prokariotske stanice		10.10.2022.

Cilj nastavne teme <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i>	
Usvajanje znanja o prokariotskim stanicama.	
Ključni pojmovi	Temeljni koncepti
Prokariotske stanice, arheje, bakterije, gram-pozitivne bakterije, gram-negativne bakterije, nukleoid, plazmid, vrenje, sterilizacija, pasterizacija.	<p>Prokariotske stanice jednostavnije su građe od eukariotskih stanica, nemaju pravu jezgru ni membranom omeđene organele.</p> <p>Arheje su mikroorganizmi koji, osim staništa s umjerenim ekološkim uvjetima, nastanjuju i staništa s ekstremnim uvjetima.</p> <p>Prokariotska stanica sadrži kapsulu, staničnu stijenkicu, staničnu membranu, piluse, bičeve ili flagele, citoplazmu, nukleoid, plazmid i ribosome.</p> <p>Gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana i postupkom bojenja po Gramu oboje se plavoljubičasto. Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana i po Gramu se oboje crveno.</p> <p>Nukleoid je genski materijal kojeg čini jedna kružna molekula DNA.</p> <p>Plazmid je kružna molekula DNA i sadrži gene koji bakterijskoj stanici daju povoljna obilježja (otpornost na antibiotike i slično).</p> <p>Sterilizacija je postupak uništavanja svih vrsta mikroorganizama, a provodi se različitim sredstvima i postupcima, primjerice zagrijavanjem tvari na temperaturi višoj od 100 °C.</p> <p>Pasterizacija je postupak koji se provodi na temperaturama nižim od 100 °C.</p>
Kontekst poučavanja koncepta <i>Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).</i>	
<p>Na primjeru stabla života (podjela živog svijeta) učenici zaključuju da arheje i bakterije pripadaju prokariotima.</p> <p>Koristeći slikovni prikaz građe prokariotske i eukariotske stanice učenici uočavaju razlike u njihovim strukturama.</p> <p>Pomoću slikovnih prikaza vrućih i kiselih geizira te slanih staništa učenici zaključuju kakva staništa naseljavaju arheje.</p> <p>Pomoću slikovnih prikaza mogućih oblika bakterijskih stanica učenici predlažu podjelu bakterija prema obliku stanice.</p> <p>Koristeći organizator pažnje učenici navode stanične dijelove i objašnjavaju njihove uloge.</p> <p>Mikroskopiranjem učenici uočavaju razlike između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.</p>	

Odgojno-obrazovni ishodi <i>Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i>	
BIO SŠ A.3.1.	Analizira procese kruženja tvari, vezanja i pretvorbi energije na razini stanice te ih povezuje s funkcioniranjem organizama.
BIO SŠ C.3.1.	Povezuje pojavu novih svojstava s usložnjavanjem stanice i objašnjava specijalizaciju stanica u složenijim sustavima.
BIO SŠ B.3.2.	Analizira posljedice narušavanja homeostaze.
BIO SŠ D.3.1.	Primjenjuje osnovna načela i metodologiju znanstvenoga istraživanja kritički prosuđujući rezultate te opisuje posljedice razvoja znanstvene misli tijekom povijesti.

Očekivanja međupredmetnih tema <i>Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i>	
uku. A.4./5.3.	Kreativno mišljenje Učenik kreativno djeluje u različitim područjima učenja.
uku A.4./5.4.	Kritičko mišljenje Učenik samostalno kritički promišlja i vrednuje ideje.
uku A.4./5.1.	Upravljanje informacijama Učenik samostalno traži nove informacije iz različitih izvora, transformira ih u novo znanje i uspješno primjenjuje pri rješavanju problema.
osr. B.5.2.	Suradnički uči i radi u timu.

Br. Ishoda u razradi(RI/IA)	Razrada ishoda <i>Koristiti prema Kurikulumu.</i> Ishodi aktivnosti <i>Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.</i>	Zadatak/ primjer pitanja za provjeru <i>Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.</i>	KR	PU
BIO SŠ A.3.1.2.	Analizira metaboličke procese na razini stanice.	<ul style="list-style-type: none"> - Koje bakterije prema načinu prehrane sudjeluju u procesu vrenja? - Što je vrenje? - Koje tipove vrenja razlikujemo? - U kojoj se industriji primjenjuje proces vrenja? 	R2 R1 R1 R2	+/- + +/- +/-
BIO SŠ C.3.1.1.	Povezuje građu i uloge staničnih dijelova.	<ul style="list-style-type: none"> - Koja je uloga stanične stijenke? - Kako se naziva opna koja obavija citoplazmu i koja je njena uloga? - Je li možete pretpostaviti kako se naziva duga izbočina na kraju bakterije i koja je njena uloga? - Kako se naziva molekula koja sadrži gensku uputu za funkcioniranje stanice? 	R2 R2 R2 R1	+/- +/- +/- +

		<ul style="list-style-type: none"> - Koje su uloge gena koje sadrži plazmid? - Kako se nazivaju strukture na kojima se odvija proces sinteze proteina? 	R2 R1	+/- +/-
BIO SŠ B.3.2.3.	Analizira utjecaj okolišnih čimbenika i patogena na razvoj bolesti	<ul style="list-style-type: none"> - Koje primjere bakterijskih infekcija poznajete? - Na koje načine se sprječava širenje patogenih bakterija? - Postoji li mogućnost da bakterije razviju mehanizam otpornosti na antibiotike? 	R2 R2 R2	+/- + +
BIO SŠ D.3.1.1.	Promatra i prikuplja podatke te donosi zaključke tijekom učenja i poučavanja.	<ul style="list-style-type: none"> - Koje su razlike u izgledu mikroskopskih preparat <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Escherichia coli</i>? - Koja je razlika u građi stanične stijenke između <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Escherichia coli</i>? - Koji je uzrok različitom obojenju preparata? 	R3 R2 R2	+/- +/- +/-
<p>Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema Procjena uspješnosti učenja (PU): – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika Br. ishoda u razradi (RI): dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikuluma Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda (npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari građene od sitnih čestica; BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednostaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ C.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije) (IA): broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1. Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)</p>				

Tijek							
Tip sata	Obrada novog nastavnog sadržaja			Trajanje	Jedan sat		
BR. NASTAVNOG SATA	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST	BR. ISHODA I MPT OČEKIVANJA	KORISTITI	METODA	OBLIK RADA	TRAJANJE (min)
Početni dio	Na početku školskog sata učenike pozdravljam i predstavljam se. Učenicima pokazujem stablo života, odnosno podjelu živoga svijeta. Na koje tri domene je podijeljen živi svijet? (bakterije, arheje i eukariote, R1) Koja carstva sadrže navedene domene? (bakterije sadrže carstvo bakterija, arheje sadrže carstvo arheja, a domena eukariota sadrži četiri carstva – biljke, životinje, gljive i protoktiste, R1) Na koje dve skupine prema vrsti stanice koje posjeduju možemo podijeliti živi svijet? (prokariote i eukariote, R1) Koju vrstu stanice posjeduju prokarioti, a koju eukarioti? (prokarioti su građeni od prokariotske stanice, a eukarioti od eukariotske stanice, R1) Najavljujem cilj sata i naslov	BIO SŠ D.3.1.1.	P PP	I R	I F	5	

	nastavne jedinice zapisujem na ploču „Prokariotske stanice“.					
Središnji dio	Drugi slajd prikazuje usporedbu građe prokariotske i eukariotske stanice. Koje su osnovne razlike u građi prokariotske i eukariotske stanice? (prokariotske stanice su jednostavnije građe, nemaju pravu jezgru i organeli nisu obavijeni membranom, R2)	BIO SŠ D.3.1.1.	P PP	I R	I F	2
	Koje jednostanične organizme svrstavamo u prokariote? (arheje i bakterije, R1) Učenicima navodim da arheje imaju isti tip stanične građe kao i bakterije, ali da se od njih razlikuju po građi stanične stijenke, sastavu membranskih lipida i po molekuli rRNA. Pokazujem sliku vrućeg kiselog gejzira i učenike pitam u kakvim ekstremnim uvjetima žive arheje (visoka temperatura, niski pH, R1). Navodim da arheje koje žive na opisanom staništu nazivamo termoacidofilima. Pokazujem sliku Mrtvog mora i učenike pitam u kakvim ekstremnim uvjetima živi ovaj tip arheja (slano stanište, R1). Navodim da arheje koje žive na opisanom staništu nazivamo halofili. Učenicima ukazujem da najraznolikija skupina arheja jesu metanogene arheje. Zašto su dobile ovaj karakterističan naziv? (proizvode metan, R1). Objašnjavam da metan proizvode redukcijom ugljikova(IV) oksida vodikom ili iz acetata. U kojim staništima živi ovaj tip arheja? (močvarna staništa i probavni sustav nekih životinja, R2)	BIO SŠ D.3.1.1.	P PP	I R	I F	5
	Učenicima pokazujem četvrti slajd na kojem je prikazana podjela bakterija prema obliku stanice. Koja je podjela bakterija prema obliku stanice? (kuglaste, štapičaste, spiralne, u obliku zareza, R2). Navodim kako se bakterije mogu podijeliti i prema načinu prehrane. Koja je podjela bakterija prema načinu prehrane? (autotrofne – fotoautotrofne i kemoautotrofne, heterotrofne – patogene, saprofitske i simbiotske, R2). Učenike upoznajem sa staničnim dijelovima koristeći model prokariotske stanice. Istovremeno učenicima dijelim radne listove koji sadrže organizator pažnje u kojem trebaju napisati dijelove stanice i njihove uloge. Prvo pokazujem staničnu stijenku. Kako se naziva ovaj dio stanice? (stanična stijenka, R1). Koja je uloga stanične stijenke? (stanici daje oblik i pruža zaštitu od okoline, R2) Navodim da je izgrađena od peptidoglikana, odnosno od makromolekule koja se sastoji od linearno poredanih polisaharidnih lanaca međusobno povezani peptidnim mostovima. Kako se naziva opna koja obavija citoplazmu? (stanična membrana, R1) Koja je njena uloga? (omogućuje prijenos određenih molekula, R2) Uočavate li dodatnu opnu iznad stanične stijenke? (da, R1) Kako se naziva ovaj dio stanice? Pod pretpostavkom da učenici ne znaju naziv, navodim da se	BIO SŠ C.3.1.1.	P PP OP	I R	I F	1 0

	<p>naziva kapsula. Koja je uloga kapsule? (zaštita stanice od okoline, R2) Uočavate li na kapsuli strukture nalik dlačicama? (da, R1) Koja je njihova uloga? (omogućuju kretanje i vezanje bakterije na površine, R2) Je li možete pretpostaviti kako se naziva duga izbočina na kraju bakterije i koja je njena uloga? (bič i omogućuje pokretljivost, R2) Pokazujem na modelu citoplazmu koja ispunja cijelu stanicu. Kako bi učenici razumjeli i usvojili sastav citoplazme, demonstriram pokus tako što u čašu ulijevam gel. Opišite svojstva gela? (proziran, gust) Tražim od učenika zaključak između poveznice gel-citoplazma (R3). Naglašavam da se u citoplazmi obavljaju procesi važni za život stanice. Kako se naziva molekula koja sadrži gensku uputu za funkcioniranje stanice? (molekula DNA, R1) Naglašavam da bakterije imaju kružnu molekulu DNA i da nemaju pravu jezgru poput eukariota. Navodim da neke bakterije sadrže dodatnu kružnu molekulu – plazmid. Koje su uloge gena koje sadrži plazmid? Pod pretpostavkom da učenici neće znati odgovor, postavljam im dodatna pitanje. Primjerice, jesu li imali bakterijsku infekciju zbog koje su morali uzimati određeni antibiotik. Je li antibiotik uspješno djelovao protiv infekcije? Postoji li mogućnost da bakterije razviju mehanizam otpornosti na antibiotike? (da, R1) Na temelju pitanja učenici zaključuju da plazmid može sadržavati gene zaslužne za otpornost na antibiotike. Kako se nazivaju strukture na kojima se odvija proces sinteze proteina? (ribosomi, R1)</p>					
	<p>Nakon što su se učenici upoznali s građom prokariotske stanice, učenicima sam priredila mikroskopske preparate <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Escherichia coli</i>. Učenike dijelim u grupe te im dijelim radne listove u kojima prikazuju svoje crteže mikroskopskih preparata. Koje su razlike u izgledu dvaju preparata? (mikroskopski preparat <i>Staphylococcus aureus</i> obojen je ljubičastom bojom i bakterija je kuglastog oblika, a mikroskopski preparat <i>Escherichia coli</i> obojen je crvenom bojom i bakterija je štapičastog oblika, R3) Učenicima naglašavam da su bakterije obojane metodom bojanja po Gramu. Učenicima pokazujem građu stanične stijenke <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Escherichia coli</i>. Koja je razlika u građi stanične stijenke između ovih bakterija? (različita debljina sloja peptidoglikana) Koji je uzrok različitom obojenju preparata? (razlika u debljini sloja peptidoglikana, R2). Naglašavam da gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana i postupkom bojenja po Gramu oboje se plavoljubičasto, a gram-</p>	<p>BIO SŠ D.3.1.1.</p>	<p>P PP RL E M</p>	<p>PR C I R</p>	<p>G</p>	<p>1 0</p>

	negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana i po Gramu se oboje crveno.					
	Koje bakterije prema načinu prehrane sudjeluju u procesu vrenja? (saprofitske bakterije, R2) Što je vrenje? (proces nepotpune razgradnje organskih molekula pri čemu se oslobađa mala količina energije, R1) Koje tipove vrenja razlikujemo? (maslačno, mliječno-kiselinsko vrenje i octeno vrenje, R1) U kojoj se industriji primjenjuje proces vrenja? (prehrambenoj industriji, R2) Što su probiotici i koja je njihova uloga? (vrsta lijekova pomoću kojih se obnavlja crijevna mikroflora, R2) Koje primjere bakterijskih infekcija poznajete? (upala pluća, salmoneloza, tuberkuloza, R2) Na koje načine se sprječava širenje patogenih bakterija? (dezinfekcija, sterilizacija i pasterizacija, R2) Koja je razlika između sterilizacije i pasterizacije? (sterilizacija se odvija na temperaturama višim od 100 °C, a pasterizacija na temperaturama nižim od 100 °C, R2)	BIO SŠ A.3.1.2.	PP	I R	I F	7
Završni dio	U završnom dijelu sata učenicima dijelim listove za ponavljanje pomoću kojih provjeravam razinu razumijevanja i stupanj usvojenog znanja.					6
<p>Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U – učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)</p> <p>Koristiti u izvedbi: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, VL – video lekcija, APP – digitalni alat, P/SU – platforma/sustav učenja na daljinu, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL – anketni listić TM – tekstualni materijali (dodati prema potrebi)</p> <p>Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje</p> <p>Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno</p>						

Materijalna priprema *Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvorna stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.*

Izvorna stvarnost: mikroskop, mikroskopski preparati *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.
Nastavna sredstva: PowerPoint prezentacija, radni list, organizator pažnje, model prokariotske stanice, list za ponavljanje, živa riječ nastavnika.
Nastavna pomagala: ploča, kreda, računalo, LCD projektor.

Plan učničkog zapisa *Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.*

PROKARIOTSKJE STANICE

Arheje: metanogene, termoacidofilne i halofili

Podjela bakterija prema obliku stanice: štapićaste-bacili, kuglaste-koki, spiralnog oblika-spirili, spirohete, u obliku zarez-a-vibrioni

Podjela bakterija prema načinu prehrane: - autotrofne (fotoautotrofne i kemoautotrofne)
-heterotrofne (patogene, simbiotske i saprofitske)

Gram-pozitivne bakterije – deblji sloj peptidoglikana

Gram-negativne bakterije – tanji sloj peptidoglikana

Vrednovanje *Različiti pristupi vrednovanju.*

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
Kroz pitanja koja postavljam tijekom nastavnog sata provjeravam jesu li učenici sve razumjeli i objašnjavam moguće nejasnoće.	Na kraju nastavnog sata učenike pitam je li im sve jasno i trebam li im još što dodatno objasniti.	U završnom dijelu sata učenicima dijelim radne listove za ponavljanje. Prozivajući učenike provjeravam razinu razumijevanja i stupanj usvojenog znanja.

Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema učenika s teškoćama u učenju.

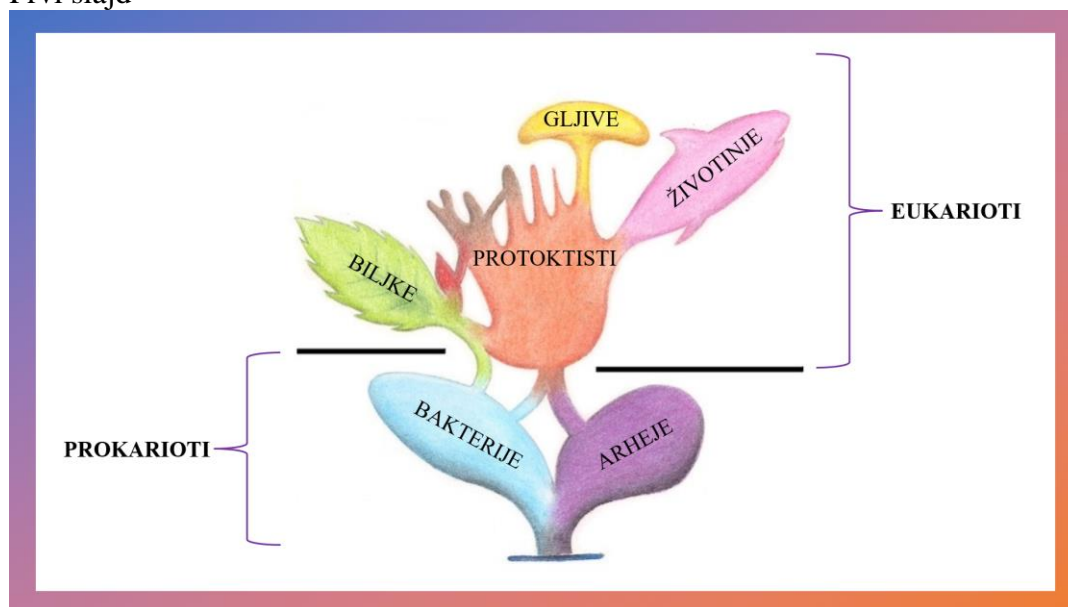
Prilagodba za darovite učenike *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema darovitih učenika.

Prilozi *Popis materijala koji će se koristiti u nastavi (radni listovi, ispis PP prezentacije i ostali materijal).*

PowerPoint prezentacija

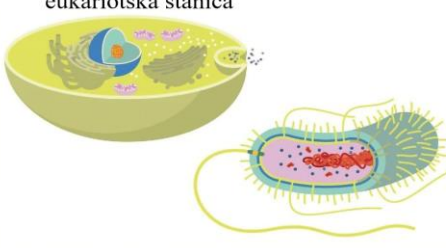
Prvi slajd



Drugi slajd

PROKARIOTSKE STANICE

eukariotska stanica



prokariotska stanica

- ↳ Jednostavnije građe
- ↳ Nemaju pravu jezgru
- ↳ Organeli nisu obavijeni membranom

Treći slajd

ARHEJE

- ↳ Termoacidofilne bakterije
- ↳ Područja niske pH vrijednosti i visoke temperature



- ↳ Halofili
- ↳ Slana staništa




- ↳ Metanogene bakterije
- ↳ Proizvode metan redukcijom ugljikova(II) oksida vodikom ili iz acetata
- ↳ Močvarna područja, probavni sustav nekih životinja




Četvrti slajd

BAKTERIJE


Podjela bakterija prema obliku stanice




štapčaste-bacili




u obliku zareza-vibrioni



kuglaste-koki



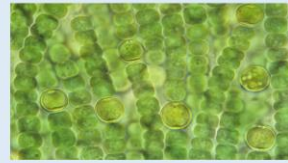
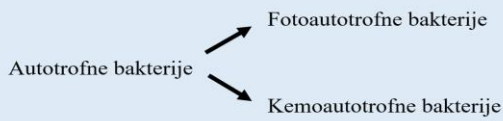
spiralnog oblika-spirili



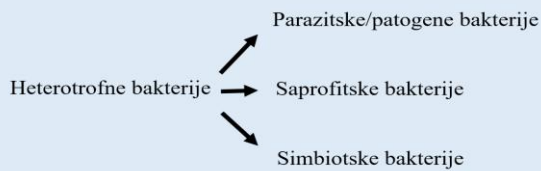
spirohete

Peti slajd

Podjela bakterija prema načinu prehrane

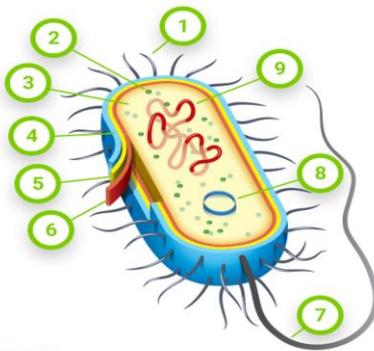


cijanobakterije



simbioza dušikovih bakterija s mahunarkama

Šesti slajd



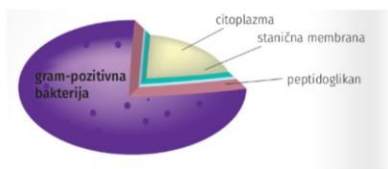
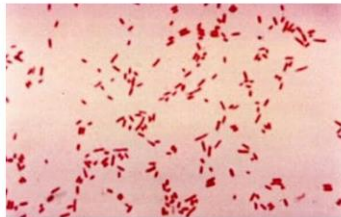
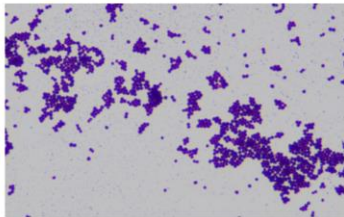
GRADA PROKARIOTSKE STANICE

1. Pili
2. Ribosom
3. Citoplazma
4. Kapsula
5. Stanična stijenka
6. Stanična membrana
7. Bič
8. Plazmid
9. Nukleoid

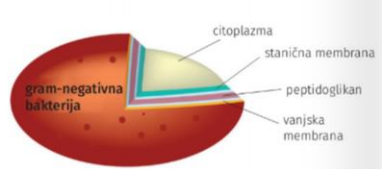
Sedmi slajd

DIO STANICE	ULOGA
Stanična membrana	Selektivno propusna
Stanična stijenka	Bakterijskoj stanici daje oblik i pruža zaštitu od okoline. Izgrađena je od peptidoglikana.
Kapsula	Građena od polisaharida koji su pričvršćeni na staničnu stijenku. Zaštita stanice od nepovoljnoga utjecaja okoliša.
Pili	Kratke proteinske strukture koje omogućuju vezanje bakterija na različite površine.
Bičevi ili flagele	Omogućuju pokretljivost.
Citoplazma	Ispunjava unutrašnjost stanice i u njoj se odvija većina kemijskih reakcija.
Nukleoid	Kružna molekula DNA koja sadrži genski materijal.
Plazmid	Kružna molekula DNA i sadrži gene koji bakterijskoj stanici daju povoljna obilježja (otpornost na antibiotike i slično).
Ribosom	Strukture izgrađene od rRNA molekule i proteina čija je uloga prevođenje genske upute u proces sinteze proteina.

Osmi slajd



Staphylococcus aureus



Escherichia coli

Deveti slajd

UTJECAJ BAKTERIJA NA ŽIVI SVIJET

Vrenje



Probiotici/prebiotici



Deseti slajd



sterilizacija



pasterizacija

naziv bakterije	naziv bolesti
<i>Chlamydia trachomatis</i>	klamidija
<i>Clostridium botulinum</i>	botulizam
<i>Listeria monocytogenes</i>	listerioza
<i>Haemophilus influenzae</i>	meningitis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberkuloza
<i>Salmonella typhi</i>	salmoneloza
<i>Staphylococcus aureus</i>	infekcije kože
<i>Streptococcus mutans</i>	karijes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	upala pluća

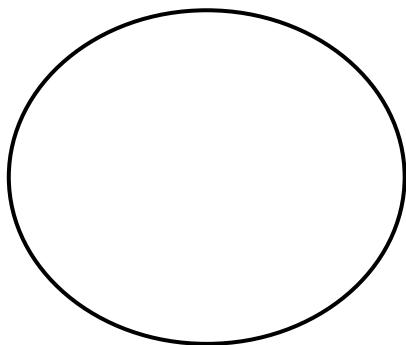
primjeri patogenih bakterija koje uzrokuju upalne procese kod čovjeka

Radni list

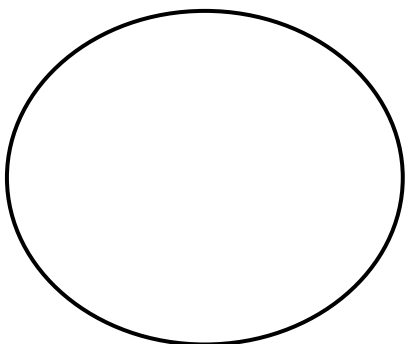


GRAM-POZITIVNE I GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE

1. U prazni krug nacrtaj bakteriju *Staphylococcus aureus* (gram-pozitivna bakterija) promatranu pod mikroskopom.



2. U prazni krug nacrtaj bakteriju *Escherichia coli* (gram-negativna bakterija) promatranu pod mikroskopom.



PROKARIOTSKE STANICE

LIST ZA PONAVLJANJE

1. Kako se nazivaju kratke proteinske strukture češće u gram-negativnih bakterija?

- a) pilusi
- b) bičevi
- c) trepetljike
- d) pseudopodiji

2. Što je obilježje jedne vrste arheja?

- a) stvaraju kisik
- b) fiksiraju dušik
- c) stvaraju spore
- d) stvaraju metan

3. Objasni ulogu saprofitskih bakterija u kruženju tvari u prirodi.

4. Pravilno razvrstaj imenovane bakterije s lijeve strane tako da napišeš odgovarajuće slovo s desne strane uz bolest koju uzrokuju.

- a) *Escherichia coli* _____ tetanus
- b) *Helicobacter pylori* _____ zubni karijes
- c) *Clostridium tetani* _____ gastritis
- d) *Streptococcus mutans* _____ upala mokraćnih kanala

5. Simbiotske bakterije žive u zajednici s drugim organizmima, primjerice dušikove bakterije koje žive u simbiozi s mahunarkama. Koje su prednosti takva načina života za mahunarke, a koje za bakterije?

6. Zašto samo neke bakterije sadrže kapsulu, bičeve i piluse?

Literatura *Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.*

Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., Biologija 3., udžbenik iz biologije za treći razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb, 2020., str. 54-65.

Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., Biologija 3., radna bilježnica iz biologije za treći razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb, 2020, str. 38-40.

Refleksija nakon poučavanja *Zabilješke nakon izvedbe nastavnog sata o uspješnosti sa sugestijama za poboljšanje.*

Tema je učenicima zanimljiva jer je nastavna jedinica prožeta sa različitim izvorima znanja (model i pokus). Također, nastavna jedinica pruža poučavanje na primjerima iz svakodnevnog života što učenicima omogućava olakšan proces pamćenja.

POPIS SLIKA

Slika 1. Zavijeni oblik i oblik kokoida <i>H. pylori</i> (izvor: Murray P.R. i sur., 2021).....	1
Slika 2. Mikromorfološka struktura <i>H. pylori</i> (izvor: https://fineartamerica.com/featured/tem-of-helicobacter-pylori-bacteria-nibscscience-photo-library.html).....	2
Slika 3. Struktura klaritromicina (izvor: Bennett J.E. i sur., 2015).....	7
Slika 4. Struktura levofloksacina (izvor: Bennett J.E. i sur., 2015).	8
Slika 5. Mehanizam djelovanja DNA giraze	9
Slika 6. Sekundarna struktura domene V i domene VI gena 23s rRNA	11
Slika 7. Kolonijalna morfologija <i>H. pylori</i> na krvnom agru (foto: Blanka Dadić)	13
Slika 8. Rezultati umnožavanja gena 23s rRNA na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)	22
Slika 9. Rezultati umnožavanja gena 23s rRNA na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)	23
Slika 10. Rezultati umnožavanja gena <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> na agaroznom gelu. Standard za određivanje veličine je BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega). (foto: Blanka Dadić)	24
Slika 11. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci V domene gena 23s rRNA izolata bakterije <i>H. pylori</i>	26
Slika 12. Prikaz nukleotidnih sekvenci V domene gena 23s rRNA izolata bakterije <i>H. pylori</i> s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (U27270, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/881379/?report=genbank). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. Gledajući redom od gore prema dolje mutacije označene crvenim krugovima su sljedeće: A2514G, A2514C, A2515G, A2515C, T2554C i T2616C..	27
Slika 13. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (<i>gyrA</i>) izolata bakterije <i>H. pylori</i> . Sekvence izolata <i>H. pylori</i> uspoređene su sa kodirajućom sekvencom gena DNA giraze, podjedinice A (<i>gyrA</i>) (L29481, https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/L29481).	30
Slika 14. Prikaz nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (<i>gyrA</i>) izolata bakterije <i>H. pylori</i> s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (L29481). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugovima su sljedeće: C261T, G271A i A272G.	31
Slika 15. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (<i>gyrA</i>) izolata bakterije <i>H. pylori</i>	33

Slika 16. Prikaz aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice A (gyrA) izolata bakterije H. pylori s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda aminokiselina u odnosu na referentnu sekvencu (L29481). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U prvom redu gledajući od gore prema dolje mutacije označene crvenim krugom su sljedeće: D91G i D91N.34

Slika 17. Prikaz poravnatih nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (gyrB) izolata bakterije H. pylori. Sekvence izolata H. pylori uspoređene su sa kodirajućom sekvencom gena DNA giraze, podjedinice B (gyrB) (EJB50619, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/api/fasta/EJB50619.1?lineLimit=1000>).35

Slika 18. Prikaz nukleotidnih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (gyrB) izolata bakterije H. pylori s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda nukleotida u odnosu na referentnu sekvencu (EJB50619). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugovima jesu sljedeće: A1441G, T1443G i G1451A.36

Slika 19. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (gyrB) izolata bakterije H. pylori.38

Slika 20. Prikaz poravnatih aminokiselinskih sekvenci DNA giraze, podjedinice B (gyrB) izolata bakterije H. pylori s prikazom podudaranja (istovjetnosti) slijeda aminokiselina u odnosu na referentnu sekvencu (EJB50619). Istovjetne sekvence prikazane su točkom. U drugom redu gledajući s lijeva na desno mutacije označene crvenim krugom jesu: N481E, N481D i N484K.39

POPIS TABLICA

Tablica 1. Rezultati određivanja koncentracija uzoraka DNA.	15
Tablica 2. Slijed nukleotida početnica korištenih prilikom umnožavanja gena 23s rRNA, gyrA i gyrB metodom PCR (izvor: Noguchi N. i sur., 2007)	16
Tablica 3. Sastojci za PCR reakcijsku smjesu	16
Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za gen 23s rRNA (izvor: Rimbara E. i sur., 2013) ²⁶	17
Tablica 5. Uvjeti reakcije PCR za gene gyrA i gyrB (izvor: Wani F.A. i sur., 2018) ²⁷	17
Tablica 6. Rezultati određivanja osjetljivosti izolata <i>H. pylori</i> na klaritromicin i levofloksacin	21
Tablica 7. Usporedba rezultata antibiograma sa rezultatima analize sekvenci V domene gena 23s rRNA.	28
Tablica 8. Povezanost baznih supstitucija sa supstitucijama aminokiselina.....	32
Tablica 9. Povezanost baznih supstitucija sa supstitucijama aminokiselina.....	37
Tablica 10. Usporedba rezultata antibiograma sa rezultatima analize sekvenci podjedinica A (gyrA) i B (gyrB) DNA giraze.....	40
Tablica 11. Višestruka rezistencija na klaritromicin i levofloksacin kod izolata bakterije <i>H. pylori</i>	43

POPIS LITERATURE

1. Öztekin M., Yılmaz B. A., Ağagündüz and Capasso R. Overview of *Helicobacter pylori* Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects 1. Published online 2021:1-19.
2. Kalenić S., Mlinarić-Missoni E. i suradnici. Medicinska Bakteriologija i Mikologija, Medicinska naklada, Zagreb, drugo izdanje, 2005.
3. Baj J., Forma A., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D., Maciejewski R. *Helicobacter pylori* Virulence Factors — Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. Published online 2021:1-37.
4. Bennett J.E., Dolin R. Blaser M., Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, SMTE Books, Philadelphia, 8 izdanje, 2015.
5. Murray P.R., Rosenthal K.S. Pfaller M.A. Medical Microbiology, Elsevier, 9 izdanje, 2021.
6. Ishaq S., Nunn L., *Helicobacter pylori* and gastric cancer : a state of the art review. 2015;8(6):6-14.
7. Sabbagh P., Mohammadnia-afrouzi M., Javanian M., Babazadeh A., Koppolu V., Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals , options , and limitations. Published online 2019:55-66.
8. Fohner A., Sparreboom A., Altman R.B., Klein T.E., PharmGKB summary: macrolide antibiotic pathway, pharmacokinetics/pharmacodynamics. 2017;(January). doi:10.1097/FPC.0000000000000270
9. Tshibangu-Kabamba E., Yamaoka Y., *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(9):613-629. doi:10.1038/s41575-021-00449-x
10. Klesiewicz K., Nowak P., Karczewska E., et al., PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(2):311-315. doi:10.18388/abp.2014_1901
11. Albasha A.M., Elnosh M.M., Osman E.H., et al. *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene A2142G, A2143G, T2182C, and C2195T mutations associated with clarithromycin resistance detected in Sudanese patients. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):4-9. doi:10.1186/s12866-021-02096-3
12. Marques A.T., Vítor J.M.B., Santos A., Oleastro M., Vale F.F. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: From phenotypic to genomic approaches. *Microb*

- Genomics. 2020;6(3). doi:10.1099/mgen.0.000344
13. Kalenić S. i suradnici. Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 13 izdanje, 2013.
 14. Hooper D.C., Jacoby G.A., Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;176(1):139-148. doi:10.1111/nyas.12830.Mechanisms
 15. Haumaier F., Schneider-Fuchs A., Backert S., Vieth M., Sterlacci W., Wöhrl B.M., Rapid Detection of Quinolone Resistance Mutations in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by Real-Time PCR. *Pathogens.* 2022;11(1):1-9. doi:10.3390/pathogens11010059
 16. Aldred K.J., Kerns R.J. Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. 2014;(YEARBOOK):52-53.
 17. Matsuzaki J., Suzuki H., Tsugawa H., Nishizawa T., Hibi T., Homology model of the DNA gyrase enzyme of *Helicobacter pylori*, a target of quinolone-based eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(SUPPL. 1):7-10. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06245.x
 18. Hoffman P.S., Antibiotic resistance mechanisms of *Helicobacter pylori*., 1999;13 (3); 243-249
 19. Noguchi N., Rimbara E., Kato A., et al. Detection of mixed clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* using nested PCR and direct sequencing of DNA extracted from faeces. *J Med Microbiol.* 2007;56(9):1174-1180. doi:10.1099/jmm.0.47302-0
 20. Zhang Y., Wen Y., Xiao Q., et al. Mutations in the antibiotic target genes related to clarithromycin, metronidazole and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* strains from children in China. *Infect Drug Resist.* 2020;13:311-322. doi:10.2147/IDR.S235615
 21. Miyachi H., Miki I., Aoyama N., et al., Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter.* 2006;11(4):243-249. doi:10.1111/j.1523-5378.2006.00415.x
 22. Mannion A., Dzink-Fox J.A., Shen Z., et al. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance and gene variants in high- and low-gastric-cancer-risk populations. *J Clin Microbiol.* 2021;59(5):1-13. doi:10.1128/JCM.03203-20
 23. Rhie S.Y., Park J.Y., Shin T.S., Kim J.W., Kim B.J., Kim J.G., Discovery of a novel mutation in DNA gyrase and changes in the fluoroquinolone resistance of *Helicobacter pylori* over a 14-year period: A single center study in korea. *Antibiotics.* 2020;9(6). doi:10.3390/antibiotics9060287
 24. Wang L.H., Cheng H., Hu F.L., Li J., Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-

- resistant *Helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol.* 2010;16(18):2272-2277. doi:10.3748/wjg.v16.i18.2272
25. Dna M. MACHEREY-NAGEL User manual, Genomic DNA from microorganisms. 2021;(November). www.mn-net.comwww.mn-net.com
 26. Rimbara E., Sasatsu M., Graham D.Y., PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013;943:279-287. doi:10.1007/978-1-60327-353-4_19
 27. Wani F.A., Bashir G., Khan M.A., Zargar S.A., Rasool Z., Qadri Q., Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A mutational analysis from a tertiary care hospital in Kashmir, India. *Indian J Med Microbiol.* 2018;36(2):265-272. doi:10.4103/ijmm.IJMM_18_19
 28. Promega. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin. *Promega.* Published online 2010:1-13. <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/?catNum=A9282>
 29. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
 30. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
 31. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M., Barton, G.J (2009), "Jalview version 2: A Multiple Sequence Alignment and Analysis Workbench," *Bioinformatics* 25 (9) 1189-1191 doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
 32. Osaki T., Mabe K., Zaman C., et al., Usefulness of detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from fecal specimens for young adults treated with eradication therapy. *Helicobacter.* 2017;22(5):1-6. doi:10.1111/hel.12396
 33. Kim K.S., Kang J.O, Eun C.S., Han D.S., Choi T.Y., Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci.* 2002;17(5):599-603. doi:10.3346/jkms.2002.17.5.599
 34. Khan R., Nahar S., Sultana J., Ahmad M.M., Rahman M., T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3567-3569. doi:10.1128/AAC.48.9.3567-3569.2004
 35. Lok C.H., Zhu D., Wang J., et al., Phenotype and molecular detection of clarithromycin

and levofloxacin resistance in helicobacter pylori clinical isolates in Beijing. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2145-2153. doi:10.2147/IDR.S249370

SKRAĆENICE

LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	Lipopolisaharid
VacA	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>	Vakuolizirajući citotoksin A
CagA	<i>Cytotoxin-associated gene A</i>	Citotoksinu pridruženi gen A
cagPAI	<i>Cag pathogenicity island</i>	Cag otok patogenosti
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktivni kisikovi spojevi
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>	Reaktivni dušikovi spojevi
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoksiribonukleinska kiselina
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>	Enzimski imunotest
ICA	<i>Immunochromatography assay</i>	Imunokromatografski test
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>	Američka agencija za hranu i lijekove
WHO	<i>World Health Organization</i>	Svjetska zdravstvena organizacija
QRDR	<i>Quinolone resistance – determining region</i>	Determinirajuća regija za rezistenciju na kinoline
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>	Minimalna inhibitorna koncentracija
EHSG	<i>European Helicobacter Study Group</i>	Europska grupa za studij infekcije <i>Helicobacter pylori</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>	Sekvenciranje nove generacije
pb	<i>Base pair</i>	Parovi baza
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Lančana reakcija polimerazom