

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka MATJAŠIČ

**DETEKCIJA GENOV ZA KARBAPENEMAZE PO  
GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ IN  
KONJUGATIVNI PRENOS GENA *bla*<sub>NDM-1</sub>**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka MATJAŠIČ

**DETEKCIJA GENOV ZA KARBAPENEMAZE PO GRAMU  
NEGATIVNIH BAKTERIJ IN KONJUGATIVNI  
PRENOS GENA *bla*<sub>NDM-1</sub>**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETECTION OF CARBAPENEMASE GENES IN GRAM NEGATIVE  
BACTERIA AND CONJUGATIVE TRANSFER OF GENE *bla*<sub>NDM-1</sub>**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzentko prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec.

Mentorica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona Zalar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 26.04.2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Alenka Matjašič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK UDK 579:579.84.2/.2(043.2)=163.6
- KG Karbapenemi/odpornost/*P. aeruginosa*/*Acinetobacter* spp./*Enterobacteriaceae*/  
prevalenca karbapenemaz v Sloveniji/PCR/NDM-1/konjugativni prenos gena  
*bla*<sub>NDM-1</sub>
- AV MATJAŠIČ, Alenka
- SA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca  
(recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2012
- IN DETEKCIJA GENOV ZA KARBAPENEMAZE PO GRAMU NEGATIVNIH  
BAKTERIJ IN KONJUGATIVNI PRENOS GENA *bla*<sub>NDM-1</sub>
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 72 str., 11 pregl., 10 sl., 6 pril., 97 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Karbapenemi so pomembna, velikokrat edina protimikrobna učinkovina za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo večkratno odporne po Gramu negativne bakterije. V zadnjem času množična in neustrezna uporaba teh učinkovin je povzročila povečanje deleža proti karbapenemom odpornih bakterij in tako so trenutno z medicinskega vidika najbolj zaskrbljujoče bakterije, ki izločajo karbapenemaze. V zbirki 31 izolatov *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), 32 izolatov *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) in 4 izolatov *Escherichia coli* (*E. coli*), ki so jih izolirali pri bolnikih, smo z metodo PCR preverili prisotnost karbapenemaznih genov. Našli smo jih le pri izolatih *P. aeruginosa*. Gen za OXA-50 smo odkrili pri 93,5 % izolatov, gen za OXA-60 pri 6,5 % izolatov. Pri izolatu MB3 smo dokazali gen za VIM-1. Ker je to prvi opisani primer bakterije, ki izloča VIM, v Sloveniji, smo sevu z metodo MLST določili sekvenčni tip. Gre za ST621, ki se pojavlja v nekaterih evropskih državah in v Argentini in je uspešna epidemična klonaska linija *P. aeruginosa*. Ker so geni za VIM vključeni v integrone razreda 1, smo tudi pri našem izolatu preverili prisotnost integrona. Uvrstili smo ga v razred 1. V zadnjem času je v središču pozornosti širjenje večkratno odpornih bakterij, ki imajo zapis za NDM-1. Iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo dobili tri seve, ki so imeli zapis za NDM-1. S konjugacijo smo determinanto odpornosti uspešno prenesli v recipientski sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Dokazali smo horizontalni prenos plazmidov tudi med nesorodnima bakterijama *A. baumannii* in *E. coli*. Frekvenca konjugacije je bila, pričakovano, manjša kot frekvenca pri sevih *K. pneumoniae*. Iz vseh 4 donorskih sevov in 4 transkonjugant smo izolirali plazmidno DNA. Pri vseh vzorcih smo zasledili prisotnosti velikih plazmidov, ki pa so bili nestabilni in so se tekom analize razgradili. Restrikcijaska analiza plazmidov nam tako ni uspela.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC UDC 579:579.84.2/.2(043.2)=163.6
- CX Carbapenems/resistance/*P. aeruginosa*/*Acinetobacter* spp./*Enterobacteriaceae*/  
prevalence of carbapenemases in Slovenia/PCR/NDM-1/conjugative transfer of  
gene *bla*<sub>NDM-1</sub>
- AU MATJAŠIČ, Alenka
- AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC Marjanca  
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2012
- TI DETECTION OF CARBAPENEMASE GENES IN GRAM NEGATIVE  
BACTERIA AND CONJUGATIVE TRANSFER OF GENE *bla*<sub>NDM-1</sub>
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIII, 72 p., 11 tab., 10 fig., 6 ann., 97 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Carbapenems are important and often the only therapeutic agents to treat severe nosocomial infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria. Massive and inappropriate usage of these antibiotics has caused an increase of carbapenem-resistant bacteria. Currently, the most worrisome from medical aspect are carbapenemase-producing bacteria. A total of 31 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) isolates, 32 *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolates and 4 *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates isolated from patients were screened by PCR analysis for the presence of carbapenemase genes. We detected them only in *P. aeruginosa* isolates. Gene for OXA-50 was detected in 93.5% of isolates and gene for OXA-60 in 6.5% of isolates. We demonstrated the gene for VIM-1 in one isolate (designated MB3). Since this is the first reported VIM-producing *P. aeruginosa* strain in Slovenia we used a multilocus sequence typing (MLST) scheme to determine the sequence type of the strain. It was ST621. ST621 clonal lineage is a successful *P. aeruginosa* epidemic clone which is disseminated in some European countries and in Argentina. Genes *bla*<sub>VIM</sub> are found in class 1 integrons. We have confirmed its presence in our isolate and we classified it as class 1. Recently, the most worrisome is the spread of NDM-1-producing multiresistant Gram-negative bacteria. 3 NDM-1-positive strains, identified at Institute of microbiology and immunology of Medical faculty, University of Ljubljana, were analysed. To recipient strain *E. coli* J53 Az<sup>r</sup> the carbapenemase resistance was transferred by conjugation. We demonstrated the horizontal transfer of plasmids between unrelated bacteria, *A. baumannii* and *E. coli*. The frequency of conjugation was, as expected, lower than that of *K. pneumoniae* strains. We isolated plasmids from all 4 donor strains and 4 transconjugants. We observed the presence of large plasmids in all of our samples. This plasmids were unstable and degraded during the analysis. Plasmid restriction was unsuccessful.

## KAZALO VSEBINE

	<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....	<b>III</b>
	<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b> .....	<b>IV</b>
	<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
	<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VIII</b>
	<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IX</b>
	<b>KAZALO PRILOG</b> .....	<b>X</b>
	<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>XI</b>
<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA .....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1	ANTIBIOTIKI/PROTIMIKROBNE UČINKOVINE .....	3
2.1.1	<b><i>β</i>-laktami</b> .....	4
2.1.2	<b>Karbapenemi</b> .....	6
2.2	ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM.....	7
2.2.1	<b>Odpornost proti <i>β</i>-laktamom</b> .....	7
2.2.2	<b>Odpornost proti karbapenemom</b> .....	10
2.3	RAZŠIRJANJE ZAPISOV ZA ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM MED BAKTERIJAMI.....	15
2.3.1	<b>Plazmidi</b> .....	16
2.3.2	<b>Integroni</b> .....	16
2.4	PREUČEVANE PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE.....	17
2.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.4.2	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	19
2.4.3	<i>Escherichia coli</i> .....	19
2.4.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
2.5	DETEKCIJA GENOV ZA KARBAPENEMAZE .....	21
2.5.1	<b>Fenotipske metode</b> .....	21
2.5.2	<b>Genotipske metode</b> .....	22
2.6	GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST NAJPOMEMBNEJŠIH KARBAPENEMAZ ....	22

<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>27</b>
3.1	MATERIAL.....	27
<b>3.1.1</b>	<b>Bakterijski sevi</b> .....	<b>27</b>
3.1.1.1	<i>Klinični izolati</i> .....	27
3.1.1.2	<i>Laboratorijski sevi</i> .....	27
<b>3.1.2</b>	<b>Gojišča</b> .....	<b>28</b>
3.1.2.1	<i>Priprava gojišč Luria-Bertani (LB)</i> .....	28
3.1.2.2	<i>Priprava tekočih gojišč BHI (brain-heart infusion)</i> .....	28
3.1.2.3	<i>Priprava trdnih gojišč HA (hranilni agar)</i> .....	29
3.1.2.4	<i>Priprava trdnih gojišč KA (krvni agar)</i> .....	29
<b>3.1.3</b>	<b>Kemikalije</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Encimi</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Pufri, raztopine in reagenti</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Začetni oligonukleotidi</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Kompleti</b> .....	<b>32</b>
3.1.7.1	<i>Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela</i> .....	32
3.1.7.2	<i>Komplet za izolacijo plazmidne DNA</i> .....	32
<b>3.1.8</b>	<b>Pribor in oprema</b> .....	<b>33</b>
3.2	METODE.....	34
<b>3.2.1</b>	<b>Fenotipske metode</b> .....	<b>34</b>
3.2.1.1	<i>Izolacija in identifikacija sevov</i> .....	34
<b>3.2.2</b>	<b>Genotipske metode</b> .....	<b>34</b>
3.2.2.1	<i>Priprava matrične DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</i> .....	34
3.2.2.1.1	<i>Priprava bakterijskih lizatov v vodi</i> .....	34
3.2.2.1.2	<i>Priprava bakterijskih lizatov v pufri TE</i> .....	34
3.2.2.2	<i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</i> .....	35
3.2.2.2.1	<i>Sestava reakcijskih mešanic za PCR</i> .....	35
3.2.2.2.2	<i>Začetni oligonukleotidi in razmere pomnoževanja z reakcijo PCR</i> .....	36
3.2.2.3	<i>Agarozna gelska elektroforeza</i> .....	39
3.2.2.4	<i>Čiščenje fragmenta, dobljenega v reakciji PCR in ugotavljanje njegovega nukleotidnega zaporedja</i> .....	40
3.2.2.5	<i>Genotipska identifikacija na podlagi nukleotidnega zaporedja gena</i> .....	40
3.2.2.6	<i>Uvrstitev seva <i>P. aeruginosa</i> z oznako MB3 v sekvenčno skupino na osnovi MLST</i> .....	41

3.2.2.7	<i>Ugotavljanje prisotnosti integrona in uvrstitev v razred</i> .....	41
3.2.2.8	<i>Konjugativni prenos plazmida z zapisom za NDM-1 v laboratorijski sev E. coli J53 Az<sup>r</sup></i> .....	41
3.2.2.9	<i>Analiza plazmidov izoliranih iz donorskih sevov in transkonjugant</i> .....	43
3.2.2.9.1	<i>Izolacija plazmidne DNA</i> .....	43
3.2.2.9.2	<i>Restrikcija izolirane plazmidne DNA</i> .....	44
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>45</b>
4.1	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH ZAPISOV ODPORNOSTI PROTI KARBAPENEMOM .....	45
4.2	UVRSTITEV SEVA <i>P. aeruginosa</i> Z OZNAKO MB3 V SEKVENČNO SKUPINO (ST) NA OSNOVI MLST .....	46
4.3	INTEGRON IZOLATA MB3 BAKTERIJE <i>P. aeruginosa</i> .....	47
4.4	ANALIZA TRANSKONJUGANT .....	48
4.4.1	Uspešnost konjugativnega prenosa.....	48
4.4.2	Frekvenca konjugacije .....	50
4.5	IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA .....	50
4.6	ANALIZA PLAZMIDOV IZOLIRANIH IZ NDM-1 POZITIVNIH DONORSKIH SEVOV IN TRANSKONJUGANT .....	52
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>64</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1.</b>	Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin in skupine protimikrobnih učinkovin, ki na tarčno mesto učinkujejo .....	4
<b>Preglednica 2.</b>	Glavne skupine $\beta$ -laktamskih antibiotikov in nekateri predstavniki posamezne skupine .....	5
<b>Preglednica 3.</b>	Klasifikacija $\beta$ -laktamaz .....	9
<b>Preglednica 4.</b>	Klasifikacija karbapenemaz, njihov substratni in inhibitorski profil ter prisotnost pri bakterijskih vrstah.....	13
<b>Preglednica 5.</b>	Funkcija genov, ki so vključeni v analizo z MLST in njihovo mesto na genomu.....	18
<b>Preglednica 6.</b>	Založna in končna koncentracija protimikrobnih učinkovin v gojišču LB. ....	28
<b>Preglednica 7.</b>	Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, PCR program in velikost pomnožka PCR.....	36
<b>Preglednica 8.</b>	Začetni oligonukleotidi za MLST pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i> , PCR-program in velikost pomnožka PCR (Curran in sod., 2004).....	39
<b>Preglednica 9.</b>	Transkonjugante, iz katerih smo izolirali plazmidno DNA.....	44
<b>Preglednica 10.</b>	Kombinacije alelov sedmih gospodinjskih genov in sekvenčna skupina (ST).....	47
<b>Preglednica 11.</b>	Transkonjugante, ki smo jih izolirali iz selektivnih gojišč in pri katerih smo z metodo PCR preverili uspešnost konjugativnega prenosa plazmida, na katerem je zapis za gen <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> . ....	49

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1.</b>	Molekularna zgradba karbapenemov in mesto delovanja $\beta$ -laktamaz.....	11
<b>Slika 2.</b>	Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo KPC.....	23
<b>Slika 3.</b>	Svetovna (A) in evropska (B) geografska razširjenost enterobakterij, ki producirajo VIM in IMP .....	24
<b>Slika 4.</b>	Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo NDM-1.....	25
<b>Slika 5.</b>	Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo karbapenemaze tipa OXA-48.....	26
<b>Slika 6.</b>	Primer agaroznega gela po elektroforezi pomnožkov PCR za gen <i>bla</i> <sub>OXA-50</sub> ...	46
<b>Slika 7.</b>	Preverjanje prisotnosti plazmidov po izolaciji plazmidne DNA pri donorskih sevih in transkonjugantah .....	51
<b>Slika 8.</b>	Prisotnost plazmidov pri donorskih sevih in transkonjugantah.....	51
<b>Slika 9.</b>	Primerjava rezane plazmidne DNA (izolirane iz donorskih sevov 20150, 9526 in ABA sevov ter kontrolnega seva NCTC 13443) z nerezano plazmidno DNA .....	52
<b>Slika 10.</b>	Primer agaroznega gela po ločevanju pomnožkov PCR za gen <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> in <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> .....	60

## KAZALO PRILOG

- Priloga A.** Zbirka kliničnih sevov, ki smo jih analizirali.
- Priloga B.** Rezultati ugotavljanja prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*.
- Priloga C.** Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR za karbapenemazne gene *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>OXA-50</sub> in *bla*<sub>OXA-60</sub>.
- Priloga D.** Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR za »gospodinjske gene« *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* in *trpE* pri vzorcu MB3 *P. aeruginosa*.
- Priloga E.** Nukleotidno zaporedje ohranjenih segmentov 5'CS in 3'CS integrona razreda 1 pri vzorcu MB3 *P. aeruginosa*.
- Priloga F.** Povprečno število transkonjugant in povprečno število recipienta ter izračunane frekvence konjugacije.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. baumannii</i>	bakterija <i>Acinetobacter baumannii</i>
Amp	ampicilin
Az <sup>f</sup>	odporen proti azidu
NaAz	natrijev azid
bp	bazni par
CS	ohranjen segment (ang. "conservative segment")
Ctx	cefotaksim
Ctz	ceftazidim
DIM	imipenemaza, odkrita na Nizozemskem (ang. " <u>D</u> utch <u>i</u> mipenemase")
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. " <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid")
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (ang. " <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleotid <u>t</u> riphosphat")
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> J53 Az <sup>f</sup>	sev <i>E. coli</i> , ki je odporen proti natrijevemu azidu
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ESBL	β-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ang. " <u>e</u> xtended <u>s</u> pectrum <u>β</u> - <u>l</u> actamases")
EtBr	etidijev bromid
GES	encim z razširjenim spektrom delovanja iz Gvajane (ang. " <u>G</u> uiana <u>e</u> xtended <u>s</u> pectrum")
GIM	imipenemaza, odkrita v Nemčiji (ang. " <u>G</u> erman <u>i</u> mipenemase")
HA	hranilni agar
HGT	horizontalni prenos genov (ang. " <u>h</u> orizontal <u>g</u> ene <u>t</u> ransfer")
IMI	β-laktamaza, ki hidrolizira imipenem (ang. " <u>i</u> mipenem-hydrolyzing <u>β</u> -lactamase")
IMI MF	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
IMP	encim, aktiven proti imipenemu (ang. "active for <u>i</u> mipenem")
KA	krvni agar

kb	kilobaza
kDa	kilodalton
KPC	karbapenemaza, odkrita pri bakteriji <i>K.pneumoniae</i> (ang. " <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> ")
<i>K. pneumoniae</i>	bakterija <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
MBL	metalo- $\beta$ -laktamaza (ang. " <u>m</u> etallo- $\beta$ - <u>l</u> actamase")
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. " <u>m</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration")
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedjih (ang. " <u>m</u> ulti- <u>l</u> ocus <u>s</u> equencing <u>t</u> yping")
NaCl	natrijev klorid
NDM	metalo- $\beta$ -laktamaza iz New Delhi-ja (ang. " <u>N</u> ew <u>D</u> elhi <u>m</u> etallo- beta-lactamase")
NMC	karbapenemaza, ki ne spada v skupino metaloencimov (ang. " <u>n</u> ot- <u>m</u> etalloenzyme <u>c</u> arbapenemase")
obr./min	obrati na minuto
OXA	oksacilinaza (ang. " <u>o</u> xacillin hydrolyzing")
<i>P. aeruginosa</i>	bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicilin-vezavni proteini (ang. " <u>p</u> enicillin- <u>b</u> inding <u>p</u> roteins")
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. " <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction")
RNA	ribonukleinska kislina (ang. " <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid")
SBL	serinske beta-laktamaze (ang. " <u>s</u> erine $\beta$ - <u>l</u> actamases")
SIM	imipenemaza, odkrita v Seoulu (ang. " <u>S</u> eoul <u>i</u> mipenemase")
SME	encim, odkrit pri bakteriji <i>S. marcescens</i> (ang. " <u>S</u> erratia <u>m</u> arcescens <u>e</u> nzyme")
SPM	metalo- $\beta$ -laktamaza, odkrita v São Paulu (ang. " <u>S</u> ão <u>P</u> aulo <u>m</u> etallo- beta-lactamase")
TBE	elektroforezni pufer Tris-borat-EDTA
TE	pufer Tris-EDTA
UV	ultravijolična (svetloba)

VIM v integronu zapisana metalo- $\beta$ -laktamaza, odkrita v Veroni  
(ang. "Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase")

ZZV MB Zavod za zdravstveno varstvo Maribor

## 1 UVOD

Z odkritjem prvega antibiotika, penicilina, se je začelo novo poglavje v razvoju medicine. Uporaba antibiotikov je močno zmanjšala smrtnost zaradi bakterijskih okužb. A zaradi vedno večje uporabe antibiotikov je prišlo do selekcije proti antibiotikom odpornih sevov.

Najpogosteje uporabljeni antibiotiki so  $\beta$ -laktami. So največja skupina protimikrobnih učinkovin. Mednje uvrščamo peniciline, cefalosporine, monobaktame in karbapeneme. Odpornost proti tej skupini antibiotikov je pri po Gramu negativnih bakterijah običajno povezana z izločanjem encimov, imenovanih  $\beta$ -laktamaze, ki so zapisane v kromosomski ali plazmidni DNA. Leta 1940 so iz bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) izolirali prvo  $\beta$ -laktamazo, penicilinazo. Dobrih 20 let kasneje so zasledili pojav odpornosti proti prvi generaciji cefalosporinov. Z mutacijami v strukturnih genih nekaterih  $\beta$ -laktamaz so se pojavile nove različice  $\beta$ -laktamaz, ki so imele povečano hidrolitično aktivnost ( $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja ali ESBL). Večina genov za  $\beta$ -laktamaze je prenosljivih z visoko frekvenco, saj so del mobilnih genetskih elementov. Bakterije so tako sčasoma postale odporne proti vsem skupinam  $\beta$ -laktamov, razen karbapenemom.

Zaradi povečanja števila sevov, ki izločajo ESBL, se je povečala uporaba karbapenemov. So sredstvo zadnje izbire za zdravljenje resnih bolnišničnih okužb in drugih okužb, ki jih najpogosteje povzročajo po Gramu negativne bakterije kot so *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) in *E. coli*. Zaradi povečane uporabe pa so se, pričakovano, kmalu začeli pojavljati bakterijski sevi odporni proti karbapenemom. Najbolj razširjeni in problematični so encimi tipa IMP, VIM, NDM-1, KPC in OXA.

Bakterije, ki so odporne proti karbapenemom, postajajo svetovni zdravstveni problem, saj se geni za te encime horizontalno prenašajo med bakterijami iste vrste, različnih vrst, celo med različnimi rodovi. Tako se po vsem svetu pojavlja vedno več primerov bakterij odpornih proti karbapenemom. V okviru diplomskega dela smo želeli ugotoviti ali so sevi bakterij, ki tvorijo karbapenemaze razširjeni tudi v Sloveniji.

## 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil preveriti prisotnost in razširjenost karbapenemaznih genov po Gramu negativnih bakterij *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*, pri katerih se odpornost proti karbapenemom pojavlja najpogosteje, v Sloveniji. V ta namen smo iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in iz Zavoda za zdravstveno varstvo v Mariboru pridobili klinične izolate vrst *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom.

Iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo pridobili tri seve, ki imajo zapis za metalo- $\beta$ -laktamazo NDM-1 – respiratorna izolata bakterije *A. baumannii* in *K. pneumoniae* ter urinarni izolat bakterije *K. pneumoniae*. Ker je gen *bla*<sub>NDM-1</sub> zapisan na konjugativnem plazmidu, smo s konjugativnim prenosom poskušali plazmide iz primarnih izolatov prenesti v laboratorijski sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Namen naloge je bil tudi, da te plazmide, na katerih je gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, izoliramo in ugotovimo ali so si podobni.



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ANTIBIOTIKI/PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Antibiotiki so snovi, ki preprečujejo razmnoževanje in rast bakterij. Njihovo delovanje je bakteriostatično (zavrejo razmnoževanje) ali baktericidno (povzročijo propad celice) (Madigan in Martinko, 2006). Pojem antibiotik je leta 1942 uvedel Selman Waksman. Definiral ga je kot naravno spojino, ki jo tvorijo bakterije ali glive in že zelo razredčena zaustavi rast drugih bakterij. Danes uporabljamo izraz »antibiotik« tudi za protimikrobne učinkovine, ki so pridobljene s kemijsko modifikacijo »naravnih antibiotikov« ali so v celoti proizvod kemične sinteze (Ambrožič Avguštin, 2011). S tem se izboljšajo njihove protimikrobne in farmakološke lastnosti (Cohen in sod., 2010).

Odkritje antibiotikov predstavlja enega najpomembnejših mejnikov v razvoju medicine. Uporaba protimikrobnih učinkovin je namreč močno povečala uspešnost zdravljenja težkih bakterijskih okužb. Vendar je njihova učinkovitost čedalje pogosteje omejena zaradi vse večjega števila bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim skupinam protimikrobnih učinkovin (Gubina in Ihan, 2002).

Protimikrobne učinkovine lahko delimo glede na izvor (naravne, polysintetske in sintetske), kemijsko zgradbo ali mehanizem delovanja oziroma tarčo, na katero učinkujejo (Cohen in sod., 2010).

Znanih je mnogo različnih skupin protimikrobnih učinkovin, ki učinkujejo na različne načine. Njihovo delovanje je usmerjeno na encime ali metabolne procese, ki imajo ključno vlogo pri normalnem delovanju bakterijske celice (Cohen in sod., 2010). Glede na tarče delovanja jih delimo v skupine, ki so navedene v preglednici 1.

**Preglednica 1.** Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin in skupine protimikrobnih učinkovin, ki na tarčno mesto učinkujejo (Madigan in Martinko, 2006; Cohen in sod., 2010)

Tarča delovanja	Delovanje protimikrobne učinkovine	Skupine protimikrobnih učinkovin
Sinteza celične stene	Delujejo na sintezo peptidoglikana, ki je osnova sinteze celične stene.	$\beta$ -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi in monobaktami), glikopeptidi (vankomicin), bacitracin
Celična membrana	Delujejo kot detergenti in razgrajujejo lipidni dvosloj. Njihovo delovanje je baktericidno.	ciklični polipeptidi (polimiksini, kolistini)
Sinteza proteinov (inhibicija 30S- ribosomske podenote)	Preprečijo vezavo aminoacil-tRNA na mesto A ribosomske podenote in onemogočijo translacijo.	tetraciklini
	Vežejo se na proteine 30S-ribosomske podenote in preprečijo pravilno translacijo encima. Nastali protein se razgradi.	aminoglikozidi (streptomycin, gentamicin)
Sinteza proteinov (inhibicija 50S- ribosomske podenote)	Vežejo se na 50S-ribosomsko podenoto in preprečijo tvorbo peptidne vezi.	makrolidi, kloramfenikol in oksazolidoni
Sinteza nukleinskih kisljin	Delujejo na encime pri sintezi pirimidinov in purinov	sulfonamidi diaminopirimidini
	Zavira od DNA odvisno RNA-polimerazo in tako preprečuje sintezo RNA.	rifampin
	Zavira elongacijo RNA.	aktinomicin
	Veže se na izolevcil tRNA sintetazo in vpliva na tRNA.	mupirocin
DNA giraza in topoizomeraza IV	Ovirajo delovanje DNA-giraze in topoizomeraze in tako preprečijo superzvijanje DNA.	kinoloni (nalidikslična kislina, ciprofloksacin, norfloksacin)

### 2.1.1 $\beta$ -laktami

$\beta$ -laktami so največja in najpogosteje predpisana skupina protimikrobnih učinkovin. Vključujejo peniciline, cefalosporine, karbapeneme, monobaktame in inhibitorje  $\beta$ -laktamaz (preglednica 2). Skupna značilnost vseh je štiričlenski  $\beta$ -laktamski obroč, na katerega se pri penicilinih in karbapenemih veže petčlenski obroč in pri cefalosporinih šestčlenski. Monobaktami sekundarnega obroča nimajo (Murray in sod., 2005).  $\beta$ -laktami

se za zdravljenje okužb uporabljajo že 70 let, vse odkar so leta 1941 prvič uporabili penicilin za zdravljenje okužbe s stafilokoki in streptokoki (Cohen in sod., 2010).

**Preglednica 2.** Glavne skupine  $\beta$ -laktamskih antibiotikov in nekateri predstavniki posamezne skupine ([http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam\\_antibiotic](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam_antibiotic); Cohen in sod., 2010).

Skupina $\beta$ -laktamov	Podskupina	Predstavniki
PENICILINI		penicilin, ampicilin, meticilin, oksacilin, piperacilin, amoksiciklin
CEFALOSPORINI	1. generacija	cefaleksin, cefalotin, cefazolin, cefaloridin
	2. generacija	cefaklor, cefuroksim, cefoksitin
	3. generacija	cefotaksim, ceftazidim, cefiksim, ceftriakson
	4. generacija	cefepim, cefpirom
KARBAPENEMI		imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
MONOBAKTAMI		aztreonam
INHIBITORJI $\beta$ -LAKTAMAZ		klavulanska kislina, tazobaktam, sulbaktam

$\beta$ -laktamski antibiotiki zavirajo sintezo peptidoglikana, strukturne komponente celične stene. Delujejo tako, da se vežejo na bakterijske transpeptidaze, imenovane penicilin-vezavni proteini (PBP ali ang. "penicillin-binding proteins"), ki so v citoplazemski membrani. Transpeptidaze sodelujejo pri sintezi bakterijske celične stene - katalizirajo transpeptidacijo, proces navzkrižne povezave stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige (muraminska kislina in glikanska veriga). Zaradi stereokemične podobnosti s peptidoglikanom se PBP lahko vežejo tudi na  $\beta$ -laktamske antibiotike. V tem primeru zamreženje celične stene (transpeptidacija) ni mogoče in bakterije postanejo občutljive za lizo. Kompleksi PBP –  $\beta$ -laktam ob tem povzročijo tudi sproščanje avtolizinov, ki celico razgradijo. Delujejo proti širokemu spektru po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Madigan in Martinko, 2006).

Prekomerna uporaba teh učinkovin je povzročila selekcijo odpornih bakterij. K temu je pripomoglo tudi dejstvo, da so antibiotiki pogosto na voljo v prosti prodaji in je njihova uporaba nepremišljena (Kattan in sod., 2008).

### 2.1.2 Karbapenemi

Karbapenemi so skupina  $\beta$ -laktamskih antibiotikov. So polsintetični antibiotiki, ki imajo v primerjavi s penicilini in cefalosporini najširši spekter delovanja. Uporabljati so jih začeli pred tremi desetletji (Kattan in sod., 2008). Učinkoviti so proti večini aerobnih in anaerobnih po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Murray in sod., 2005). Podobni so penicilinom, saj se pri obeh na  $\beta$ -laktamski obroč veže petčlenski obroč. Razlikujejo se v tem, da je obroč nenasičen in manjka atom žvepla (Edwards in Betts, 2000). Njihovo delovanje je baktericidno, saj preprečijo rast in strukturno integriteto bakterijske celične stene.

Najpogosteje uporabljeni karbapenemi so imipenem (s cilastatinom), meropenem in ertapenem, vedno bolj pa tudi doripenem (Zhanel in sod., 2007). Imipenem in meropenem zlahka difundirata v bakterijsko celico in imata najširši spekter med vsemi  $\beta$ -laktami (Walther-Rasmussen in Høiby, 2007). Običajno ju uporabljajo za zdravljenje težjih bolnišničnih okužb in pri okužbah z več mikroorganizmi hkrati. Predvsem meropenem je zelo učinkovit proti enterobakterijam, vrstam iz rodov *Pseudomonas* in *Acinetobacter*, vrsti *Haemophilus influenza* in anaerobnim bakterijam. Dokaj učinkovit je tudi proti po Gramu pozitivnim kokom (<http://www.srspharma.com/carbapenems.htm>). Ertapenem zaradi njegovega edinstvenega protimikrobnega spektra (omejena aktivnost proti vrsti *P. aeruginosa*, rodu *Enterococcus* spp. in nekaterim nefermentativnim po Gramu negativnim bakterijam) uporabljajo za zdravljenje zunajbolnišničnih okužb. Doripenem je karbapenem s podobnimi značilnostmi kot meropenem, vendar je *in vivo* bolj učinkovit proti vrsti *P. aeruginosa*. V klinični uporabi je od leta 2007 (Zhanel in sod., 2007). V Sloveniji sta v uporabi imipenem in meropenem.

Uporaba karbapenemov narašča, saj so pogosto sredstvo prve izbire, s katerimi se zdravi okužbe povzročene z večkratno odpornimi enterobakterijami, ki tvorijo encime ESBL (še posebej vrsti *E. coli* in *K. pneumoniae*) (Paterson, 2000).

## 2.2 ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM

Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam je pomembna sposobnost mikroorganizma, da se ubrani pred delovanjem učinkovine, za katero je običajno občutljiv (Madigan in Martinko, 2006). Nekatere bakterijske vrste so naravno odporne proti določenim skupinam protimikrobnih učinkovin (intrinzična odpornost). Te bakterije nimajo tarčnih mest, na katere protimikrobne učinkovine delujejo ali pa dostop do takšnega mesta preprečuje sestava celične stene. Ta odpornost je specifična za določeno vrsto ali rod. Bakterije pa lahko odpornost pridobijo z mutacijami kromosomskega ali plazmidnega gena ali s horizontalnim prenosom determinante odpornosti iz druge bakterije (pridobljena odpornost) (Gubina in Ihan, 2002).

Poznamo pet glavnih mehanizmov pridobljene odpornosti: (i) neprepustnost oziroma zmanjšana prepustnost bakterijske membrane za protimikrobno učinkovino, (ii) prisotnost gena za encim, ki kemijsko modificira ali hidrolizira antibiotik, (iii) sprememba tarčnega mesta delovanja protimikrobne učinkovine, (iv) odprtje nove metabolne poti in (v) prisotnost membranskih črpalk, ki izčrpajo protimikrobno učinkovino (Madigan in Martinko, 2006; Cohen in sod., 2010).

Največkrat uporabljene protimikrobne učinkovine za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi bakterijami so  $\beta$ -laktami in kinolonske protimikrobne učinkovine, zato so proti njim pogosto tudi odporne (Cohen in sod., 2010).

### 2.2.1 Odpornost proti $\beta$ -laktamom

Odpornost proti  $\beta$ -laktamom lahko nastane na več načinov: (i) s strukturnimi spremembami PBP, (ii) s tvorbo dodatnih PBP, (iii) z uporabo alternativnih peptidoglikanskih transpeptidaz, (iv) z izgubo specifičnih membranskih porinov in s tem sprememba permeabilnosti membrane, (v) z izločanjem specifičnih  $\beta$ -laktamaz in (vi) z aktivnim izčrpavanjem antibiotika iz mesta delovanja (Murray in sod., 2005).

Najpomembnejša mehanizma odpornosti proti  $\beta$ -laktamom po Gramu pozitivnih bakterij sta spreminjanje PBP in tvorba dodatnih PBP. Pri po Gramu negativnih bakterijah pa je odpornost povezana z izločanjem  $\beta$ -laktamaz in aktivnim črpanjem protimikrobne učinkovine iz celice (Baquero in sod., 2008).

$\beta$ -laktamaze so heterogena skupina encimov, ki jih sintetizirajo nekatere bakterije in jih ščitijo pred delovanjem  $\beta$ -laktamskih protimikrobnih učinkovin. Zgrajene so iz  $\alpha$ -heliksov in  $\beta$ -nagubanih ravnin in si ne glede na zaporedje aminokislin delijo enako topologijo. Zapisane so v kromosomski ali plazmidni DNA, razlikujejo pa se po substratih, na katere delujejo in fizikalno-kemijskih lastnostih (Perez in sod., 2007). Leta 2007 je bilo znanih že več kot 700 različnih  $\beta$ -laktamaz (Perez in sod., 2007), ki se prav tako kot PBP uvrščajo v družino serinskih proteaz. Nekateri encimi so specifični za določene protimikrobne učinkovine (penicilinaze, cefalosporinaze, karbapenemaze), medtem ko imajo nekateri razširjen spekter delovanja (ESBL – ang. "extended-spectrum beta-lactamases"). Ti encimi so navzoči pri večini po Gramu negativnih bakterij in tako predstavljajo enega ključnih mehanizmov njihove odpornosti proti  $\beta$ -laktamom (Murray in sod., 2005).

Protimikrobne učinkovine inaktivirajo še preden dosežejo tarčna mesta (PBP). V prvi fazi se reverzibilno in nekovalentno vežejo na ogljikove vezi  $\beta$ -laktamskega obroča, v drugi fazi pa encim s hidroksilno skupino napade karbonilno skupino v  $\beta$ -laktamskem obroču. Na koncu se encim odcepi, nastane pa hidrolizirana in neaktivna protimikrobna učinkovina (Baquero in sod., 2008).

Plazmidno zapisani geni za  $\beta$ -laktamaze so prenosljivi z visoko frekvenco in se tako lahko hitro širijo v bakterijski združbi. Opazili so, da stopnja pojavljanja bakterij z zapisom za več  $\beta$ -laktamaz narašča, kar dodatno povečuje njihovo odpornost in večja njihovo evolucijsko prednost (Baquero in sod., 2008). Pri bolnišničnih okužbah največji problem predstavljajo ESBL,  $\beta$ -laktamaze tipa AmpC in karbapenemaze (Kattan in sod., 2008).

$\beta$ -laktamaze so na splošno klasificirane po dveh shemah: molekularna klasifikacija po Ambler-ju, ki temelji na primarnem aminokislinskem zaporedju  $\beta$ -laktamaz in jih delimo v štiri velike razrede (A: penicilinaze, cefalosporinaze in ESBL; B: metalo- $\beta$ -laktamaze;

C: cefalosporinaze; D: oksacilinaze) (Ambler, 1980; Ambler in sod., 1991) in funkcionalna klasifikacija po Bush-Jacoby-Medeiros-u, ki temelji na ločevanju encimov glede na njihov substratni profil in na njihovih lastnosti inhibicije in jih delimo v štiri večje funkcionalne skupine (1: cefalosporinaze; 2:  $\beta$ -laktamaze širokega in razširjenega spektra; 3: metalo- $\beta$ -laktamaze; 4: ostali encimi, ki še niso popolnoma raziskani) (Bush in sod., 1995; Bush in Jacoby, 2010). Z odkritjem mnogih novih  $\beta$ -laktamaz je bila klasifikacija leta 2010 posodobljena (preglednica 3) (Bush in Jacoby, 2010).

**Preglednica 3.** Klasifikacija  $\beta$ -laktamaz (Bush in Jacoby, 2010).

Molek. raz.	Funkc. sk.	Snovi, na katere encimi delujejo	Mehanizem hidrolize	Predstavniki	Inhibicija*	
					EDTA	Klavul. Kis.
C	1	penicilini, 1GC, 2GC, ob odsotnosti represorja še 3GC in aztreonam, cefamicin		K*-AmpC, P*-AmpC (ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY, LAT, FOX, MOX)	-	-
A	2	penicilini, 1GC, 2GC, 3GC, aztreonam, cefepim	serinske $\beta$ -laktamaze (serin v aktivnem mestu)	$\beta$ -laktamaze širokega in razširjenega spektra (TEM, SHV, CTX)	-	variabilna
		penicilini, 1GC, 2GC, 3GC, cefamicin, aztreonam, karbapenemi		karbapenemaze (SME, NMC, IMI, KPC, GES)	-	+
D		penicilini, 1GC, 2GC, 3GC, cefepim, karbapenemi,		OXA	-	variabilna
B	3	penicilini, 1GC, 2GC, cefamicin, karbapenemi	metalo- $\beta$ -laktamaze ( $Zn^{2+}$ v aktivnem mestu)	IMP, VIM, SIM, GIM, SPM, NDM-1	+	-
ne vključen	4	NP	NP	NP	NP	NP

**Okrajšave:** Molek. raz. – molekularni razred po Ambler-ju; Funkc. sk. – funkcionalna skupina po Bush-Jacoby-ju; Klavul. kis. – klavulanska kislina; 1,2,3GC – cefalosporini 1., 2. in 3. generacije; K\*-kromosomsko zapisan, P\*- plazmidno zapisan. **Oznaka:** \* znak + pomeni, da inhibicija je, znak – pomeni, da inhibicije ni, variabilno – učinkovitost inhibicije je različna.

Encimi ESBL hidrolizirajo peniciline, cefalosporine 1., 2., 3. generacije in nekatere cefalosporine 4. generacije ter monobaktame. Nimajo pa aktivnosti proti karbapenemom in cefamicinom. Za te encime je značilno, da njihovo delovanje zavirajo  $\beta$ -laktamazni

inhibitorji. Ta fenotipska značilnost je zelo pomembna za detekcijo in identifikacijo sevov, ki izločajo ESBL (Bush in sod., 1995; Paterson in Bonomo, 2005). Z uporabo novih protimikrobnih učinkovin so se pojavile težave, saj so nove mutante že odporne proti  $\beta$ -laktamskim inhibitorjem in v nekaterih primerih tudi proti cefalosporinom razširjenega spektra (Baquero in sod., 2008). Po Ambler-ju jih uvrščamo v molekularni razred A in D, funkcionalno pa spadajo v skupino 2b (podskupina 2be) (Bush in Jacoby, 2010).

Prve encime ESBL so opisali v Nemčiji (1983) in Franciji (1985) pri rodu *Klebsiella* spp.. ESBL so danes razširjene po vsem svetu in prisotne pri večini rodov enterobakterij (encimi ESBL tipa TEM, SHV, CTX), pa tudi pri vrsti *P. aeruginosa* in *A. baumannii* (encimi tipa PER in OXA) (Paterson in Bonomo, 2005).

Geni za EBSL so običajno na plazmidih in se tako lahko prenašajo med bakterijami iste vrste ali različnih vrst. Zaradi prisotnosti zlasti pri vrsti *E. coli*, *K. pneumoniae* in *P. aeruginosa* predstavljajo velik problem pri hospitaliziranih bolnikih. V zadnjem času pa je vse več primerov pojavljanja EBSL pozitivnih sevov pri oskrbovancih domov za ostarele (Fankhauser in sod., 2009) in nehospitaliziranih bolnikih (Baño in sod., 2004).

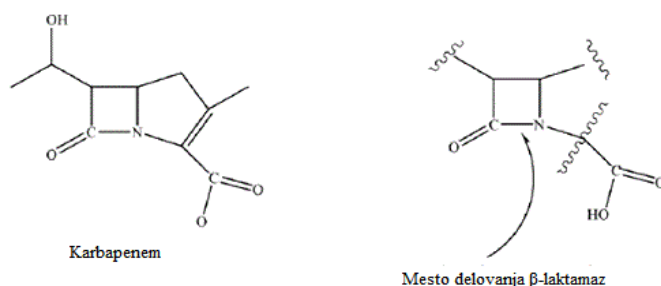
### **2.2.2 Odpornost proti karbapenemom**

Po Gramu negativne bakterije imajo 3 glavne mehanizme pridobljene odpornosti proti karbapenemom: (i) tvorba karbapenemaz ( $\beta$ -laktamaze s sposobnostjo hidrolize karbapenemov), (ii) povečana aktivnost črpalke, ki izčrpa antibiotik iz celice in (iii) izguba porinov v kombinaciji s tvorbo drugih  $\beta$ -laktamaz (ESBL ali AmpC). Porini omogočajo prehod protimikrobnih učinkovin skozi zunanjo membrano in s tem dostop do tarčnega mesta delovanja (Queenan in Bush, 2007; Cohen in sod., 2010).

Čeprav so mehanizmi odpornosti različni je trenutno najbolj zaskrbljujoča možnost tvorbe in izločanja karbapenemaz pri različnih klinično pomembnih bakterijskih vrstah (Sundin, 2009). Optimizirane doze in omejena uporaba teh protimikrobnih učinkovin bi morale omejiti pojav sevov odpornih proti karbapenemom in tako podaljšati uporabo teh snovi (Kattan in sod., 2008).



Karbapenemaze so najbolj raznolika družina  $\beta$ -laktamskih encimov. Hidrolizirajo peniciline, cefalosporine širokega spektra in vsaj delno imipenem in/ali meropenem (Nordmann in Poirel, 2002). Tako kot druge  $\beta$ -laktamaze se vežejo na  $\beta$ -laktamski obroč (slika 1) in inaktivirajo protimikrobno učinkovino (Baquero in sod., 2008).



**Slika 1.** Molekularna zgradba karbapenemov in mesto delovanja  $\beta$ -laktamaz.

EUCAST je postavila mejno vrednost MIK  $\geq 8$  mg/L za odpornost proti imipenemu in meropenemu pri enterobakterijah in nekaterih po Gramu negativnih bakterijah kot sta *P. aeruginosa* in *A. baumannii*. Vrednost MIK, ki kaže občutljivo vrsto je  $\leq 2$  mg/L ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)). Enterobakterije zraven karbapenemaz pogosto tvorijo še druge  $\beta$ -laktamaze (ESBL, AmpC). Pri vrsti *P. aeruginosa* odpornost večinoma posredujejo encimi razreda B, pri vrsti *A. baumannii* pa encimi razreda D. Vendar so enako pomembni tudi drugi mehanizmi kot so izguba porina v zunanji membrani, povečano delovanje črpalke za izčrpavanje učinkovine iz celice in spremembe PBP (Walsh in sod., 2005; Vila in sod., 2007).

Odpornost proti imipenemu in meropenemu se pojavlja pri vrsti *Enterococcus faecium*, pri protti meticilinu odpornih stafilokokih (MRSA) in pri vrsti *P. aeruginosa* (Livermore in Woodford, 2000).

Med karbapenemaze uvrščamo več družin encimov, ki jih uvrščamo v molekularni razred A, B ali D. Najbolj problematične so trenutno karbapenemaze KPC, IMP, VIM, NDM-1 in OXA-48. V preglednici 4 so navedene družine karbapenemaz, njihov substratni in inhibitorni profil ter bakterijske vrste, pri katerih so encimi (že) bili opisani.

Kromosomsko zapisane karbapenemaze naj bi prvotno ščitile celično steno pred zunanjimi dejavniki (kot so  $\beta$ -laktami in njihove komponente). Lahko pa imajo ti encimi vlogo pri regulaciji sinteze celične stene (Walsh in sod., 2005). Raziskovalci so mnenja, da so vir mobilnih genskih zapisov za karbapenemaze okoljski mikroorganizmi (Queenan in Bush, 2007).

Bakterija *Streptomyces cattleya*, ki jo najdemo v prsti, je naravni producent tienamicina, imipenem pa je kemično sintetiziran derivat tienamicina. Bakterije v okolju, ki imajo genski zapis za encime, ki so sposobni hidrolize karbapenemov, imajo tako večje možnosti preživetja (Walther-Rasmussen in Høiby, 2007; Queenan in Bush, 2007).

Prve karbapenemaze so bile pri bakterijah iz okolja prisotne še pred začetkom uporabe karbapenemov, najverjetneje kot posledica stika z naravno prisotnimi karbapenemi. To nakazuje dejstvo, da so nekatere izmed njih izolirali še pred začetkom terapevtske uporabe imipenema, ki je bil za klinično uporabo najprej odobren v ZDA leta 1985 (Medeiros, 1997). Leta 1982 so izolirali sev *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), pri katerem so kasneje identificirali gen za karbapenemazo razreda A, *bla*<sub>SME-1</sub> (Yang in sod., 1990). Leta 1984 so v ZDA pri sevu bakterije *Enterobacter cloacae* odkrili gen *bla*<sub>IMI-1</sub>. (Rasmussen in sod., 1996). Na Škotskem so leta 1985, še pred uporabo karbapenemov, pri bakteriji *A. baumannii* izolirali gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, karbapenemazo razreda D (Paton in sod., 1993). Zato predvidevajo, da ni bila klinična uporaba imipenema vzrok za nastanek teh  $\beta$ -laktamaz, pač pa so bili encimi pri bakterijah prisotni že mnogo prej (Madigan in Martinko, 2006).

Razširjenost kromosomsko zapisanih karbapenemaz je neposredno povezana z razširjenostjo sevov, ki tvorijo te encime. Nasprotno pa so gene pridobljene odpornosti odkrili kot genske kasete v integronih konjugativnih plazmidov in se tako lahko hitro in nenadzorovano širijo med bakterijami (Queenan in Bush, 2007). Hitro naraščanje primerov bakterij, ki tvorijo karbapenemaze (predvsem KPC, IMP, VIM, NDM-1 in OXA-48) je najverjetneje posledica koseleksijskih procesov, saj je na plazmidih, kjer so ti geni zapisani, pogosto prisotnih več genov odpornosti, ki posredujejo odpornost proti različnim skupinam protimikrobnih učinkovin (aminoglikozidom, sulfonamidom,  $\beta$ -laktamom širokega spektra) (Queenan in Bush, 2007).

**Preglednica 4.** Klasifikacija karbapenemaz, njihov substratni in inhibitorni profil ter prisotnost pri bakterijskih vrstah.

Mol. raz.	Funkc. sk.	Encim	Število odkritih različic <sup>#</sup>	Zapis v genomu	Prvi opis encima (bakterija, leto, država)*	Profil hidrolize <sup>a</sup>					Inhibitorni profil <sup>b</sup>			Referenca	Bakterijske vrste, pri katerih so encime opisali	
						P.	Z.C.	C.R.S	A.	K.	EDTA	K. K.	β-L. Inh.			
<b>SERINSKE KARBAPENEMAZE</b>																
A	2f	NMC	1	K	<i>E. cloacae</i> (1990, Francija, Evropa) <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	Mariotte-Boyer in sod., 2006	<i>E. cloacae</i>	
		IMI	2	K ali P	<i>E. cloacae</i> (1984, južna Kalifornija, ZDA) <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	Rasmussen in sod., 1996	<i>E. cloacae</i>	
		SME	3	K	<i>S. marcescens</i> (1982, Anglija, Evropa) <sup>3</sup>	+	+	±	+	+	-	+	+	Queenan in sod., 2000	<i>S. marcescens</i>	
		KPC	10	P	<i>K. pneumoniae</i> (1996, Severna Karolina, ZDA) <sup>4</sup>	+	+	+	+	+	-	+	+	Alba in sod., 2005	enterobakterije, <i>P. aeruginosa</i> (opisani v številnih državah po svetu)	
		GES	20	P	<i>K. pneumoniae</i> (1998, Francija, Evropa) <sup>5</sup>	+	+	+	-	±	-	+	+	Poirel in sod., 2000	<i>P. aeruginosa</i> , enterobakterije	
D	2df	OXA	232	K ali P	<i>A. baumannii</i> (1985, Škotska, Evropa) <sup>6</sup>	+	+	±	-	±	-	±	±	Walther-Rasmussen in Høiby, 2006	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , enterobakterije	
<b>METALO-β-LAKTAMAZE</b>																
B	3	IMP	33	P	<i>P. aeruginosa</i> (1988, Japonska) <sup>7</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-	Walsh in sod., 2005	<i>P. aeruginosa</i> , enterobakterije (opisani v številnih državah po svetu)	
		VIM	19	P	<i>P. aeruginosa</i> (1997, Italija, Evropa) <sup>8</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		<i>P. aeruginosa</i> , enterobakterije (opisani v številnih državah po svetu)	
		SPM	1	P	<i>P. aeruginosa</i> (1997, Sao Paulo, Brazilija) <sup>9</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		<i>P. aeruginosa</i> , enterobakterije	
		GIM	1	P	<i>P. aeruginosa</i> (2002, Nemčija, Evropa) <sup>10</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		<i>P. aeruginosa</i>	
		SIM	1	P	<i>A. baumannii</i> (2005, Seoul, Koreja) <sup>11</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	
		DIM	1	P	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (2010, Nizozemska, Evropa) <sup>12</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		Poirel in sod., 2010	<i>P. stutzeri</i>
		NDM	6	P	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> (2008, Švedska, Evropa) <sup>13</sup>	+	+	+	-	+	+	-	-		Yong in sod., 2009	enterobakterije, <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>

Legenda:

**Oznake:** # referenca: <http://www.lahey.org/Studies/> (januar 2012); \* referenca prvega opisa: <sup>1</sup> (Nordmann in sod., 1993), <sup>2</sup> (Rasmussen in sod., 1996), <sup>3</sup> (Yang in sod., 1990), <sup>4</sup> (Yigit in sod., 2001), <sup>5</sup> (Poirel in sod., 2000), <sup>6</sup> (Paton in sod., 1993), <sup>7</sup> (Watanabe in sod., 1991), <sup>8</sup> (Lauretti in sod., 1999), <sup>9</sup> (Toleman in sod., 2002), <sup>10</sup> (Castanheira in sod., 2004), <sup>11</sup> (Lee in sod., 2005), <sup>12</sup> (Poirel in sod., 2010), <sup>13</sup> (Yong in sod., 2009); <sup>a</sup> + močna hidroliza; ± šibka hidroliza; - ni merljive hidrolize; <sup>b</sup> + je inhibicija; ± variabilna inhibicija; - ni inhibicije;

**Razlaga okrajšav:** Mol. raz. – molekularni razred po Amlber-ju; Funkc. sk. – funkcionalna skupina po Bush-Jacoby-ju; K – zapis na kromosomu, P – zapis na plazmidu; P. – penicilini; ZC – zgodnji cefalosporini; CRS – cefalosporini razširjenega spektra; A. – aztreonam (monobaktami); K. – karbapenemi; K. K. – klavulanska kislina; β-L. inh. – β-laktamazni inhibitorji.

### 2.3 RAZŠIRJANJE ZAPISOV ZA ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM UČINKOVINAM MED BAKTERIJAMI

Zapisi za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, ki so posledica mutacij genov, ki niso na mobilnih genetskih elementih, se prenašajo le s klonalnim širjenjem (iz materinske na hčerinsko celico). Tak prenos imenujemo vertikalni prenos genov. Če pa je zapis za odpornost na mobilnih genetskih elementih (integroni, plazmidi, transpozoni in bakteriofagi) se ta lahko horizontalno prenaša. Horizontalni prenos genov (HGT) se ne dogaja le med bakterijami iste vrste, pač pa se lahko tudi med bakterijami različnih vrst, različnih rodov in celo med po Gramu negativnimi in po Gramu pozitivnimi bakterijami. Poznamo tri načine HGT: konjugacija, transformacija in transdukcija. Pri po Gramu negativnih bakterijah se zapisi odpornosti običajno prenašajo s konjugacijo (Madigan in Martinko, 2006).

Konjugacija je replikativni proces, pri katerem se enoverižna plazmidna DNA prenese iz donorske celice v recipientsko celico, kjer se nato tvori komplementarna veriga (horizontalni prenos). Celici morata vzpostaviti fizični stik, ki ga omogočajo posebne strukture, t.i. pili. Iz donorske celice se v celico recipienta običajno prenese plazmidna DNA (konjugativni plazmid). Če pa je plazmid vključen v kromosom celice donorja (take celice im. Hfr celice) se lahko zraven prenese tudi del kromosomske DNA donorja. Konjugacijo lahko pripravimo na več načinov. Bakterijske celice donorja in recipienta lahko inkubiramo skupaj v tekočem gojišču ali na trdni podlagi (filtrirni papir ali hranilno gojišče). Bakterijske celice recipienta, ki tekom konjugacije pridobijo plazmid oziroma del kromosomske DNA, s tem pa tudi lastnosti, ki so zapisane na preneseni DNA, izsledimo na t.i. selekcijskih gojiščih. Ta gojišča omogočajo le rast transkonjugante, to je recipient z določeno preneseno lastnostjo. Sam donor in sam recipient pa na teh gojiščih ne rasteta. Kontraselekcija proti slednjima je lahko minimalno gojišče brez določenih hranilnih snovi, sladkorjev in vitaminov ali gojišče z dodanimi protimikrobnimi učinkovinami (Madigan in Martinko, 2006).

### 2.3.1 Plazmidi

Plazmidi so majhne, dvovertične molekule DNA, velike od 1 kb do 1000 kb. Podvajajo se neodvisno od kromosomske DNA gostitelja. Večinoma so krožne oblike, a poznamo tudi plazmide linearnih oblik. Na plazmidu so genski zapisi za lastno replikacijo in za celično delovanje neesencialne geni, od katerih pa ima gostiteljska celica pogosto korist. Plazmidi so mobilni genetski elementi. Nekateri bakterije jih lahko privzamejo iz okolja, a najpogostejši način prenosa plazmidov je konjugacija. Plazmidi, ki se lahko prenašajo s konjugacijo so konjugativni. Imeti morajo genski zapis, ki je zbran v regiji *tra*. V tej regiji so genski zapisi za proteine, ki so vključeni v prenos in replikacijo DNA. Med najbolj razširjene in preučevane plazmide uvrščamo plazmide odpornosti (Madigan in Martinko, 2006).

### 2.3.2 Integroni

V plazmidno DNA so pogosto vključeni tudi posebni genetski elementi – integroni, ki nosijo enega ali več genov z zapisi za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam (Madigan in Martinko, 2006). Integroni so genetski elementi, sposobni prepoznavanja in vključitve prostih genskih kaset. Sodelujejo pri horizontalnem širjenju genov. Poznamo dve skupini integronov: integroni odpornosti (RI ali ang. "resistance integrans") in superintegroni (SI ali ang. "superintegrans"). Prvi večinoma vključujejo genske kasete z zapisom za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam in dezinfekcijskim sredstvom. Najdemo jih lahko na kromosomu, plazmidu ali transpozonu. Superintegroni pa so večji in locirani na kromosomu. Genske kasete, ki jih vključijo SI, imajo različne funkcije. Vključijo jih lahko tudi več kot 100, za razliko od RI, ki vključijo manj kot 10 genskih kaset (Fluit in Schmitz, 2004).

Poznani so trije razredi RI. Determinante odpornosti pri kliničnih izolatih najpogosteje zasledimo na integronih razreda 1, ki vsebujejo dva ohranjena segmenta (5'-CS in 3'-CS), ki obdajata regijo integriranih genskih kaset. Segment 5'-CS (ang. "conserved segment") je sestavljen iz integraznega gena *intI1*, rekombinacijskega mesta *attI1*, v katerega se z mestno specifično rekombinacijo lahko vključijo genske kasete in promotorske regije za

prepisovanje genskih kaset. 3'-CS segment običajno vključuje gene, ki posredujejo odpornost proti sulfonamidom (*sulI*) in dezinfekcijskim sredstvom (*gacEAI*). Genske kasete v teh integronih sestavlja eno samo kodirajoče zaporedje in 59 bp velik element (59be), ki ima vlogo pri prenosu in vključitvi genske kasete. Integroni razreda 1 so razširjeni med mnogimi po Gramu negativnimi bakterijami in posredujejo odpornost proti pogosto uporabljenim protimikrobnim učinkovinam kot so  $\beta$ -laktami in aminoglikozidi. Ko se ti integroni vključijo v plazmide ali transpozone je omogočen HGT med bakterijami (Gupta, 2008).

## 2.4 PREUČEVANE PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE

Po Gramu negativne bakterije *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli*, *K. pneumoniae* in *Enterobacter cloacae* pogosto povzročajo bolnišnične okužbe. Zaradi povečevanja števila večkratno odpornih sevov so te okužbe vedno težje ozdravljive. Za karbapeneme so (še) večinoma občutljivi, kadar pa se pri teh sevih pojavi odpornost proti karbapenemom je le malo alternativnih poti zdravljenja teh okužb (PHAC, 2010).

### 2.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Pseudomonas* se na osnovi analize zaporedja genov za 16S rRNA uvršča v družino *Pseudomonadaceae*, red *Pseudomonadales*, razred *Gammaproteobacteria* (Garrity in sod., 2005). Bakterija je ubikvitarna. Najdemo jo v prsti, vodi in na površinah, ki so v stiku z vodo. Kolonizira mnoge rastline in živali. Je priložnostni patogen pri ljudeh, živalih in/ali rastlinah (Kayser in sod., 2005; Todar, 2011). *P. aeruginosa* je pogosto povezana z okužbami urinarne in respiratorne poti pri ljudeh. Pogoste so tudi okužbe pri bolnikih z resnimi opeklinami in drugimi težjimi poškodbami kože ter pri bolnikih s cistično fibrozo (Madigan in Martinko, 2006). Vrsta ima več virulentnih dejavnikov, kot so toksini, encimi in adhezini, vendar pa je oportunist, ki običajno povzroča okužbe pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom (Murray in sod., 2005). V zadnjih letih so bolnišnične okužbe povzročene s *P. aeruginosa*, zaradi odpornosti bakterije proti vrsti protimikrobnih

učinkovin, postale resen problem. Bakterija *P. aeruginosa* je glavni vzrok pljučnice, povezane z uporabo respiratorja na oddelkih za intenzivno nego, kjer so bolniki bolj dovzetni za okužbe kot na ostalih oddelkih (Czekajło-Kołodziej in sod., 2006). Bakterija je že po naravi odporna proti nekaterim protimikrobnim učinkovinam, tekom zdravljenja pa lahko mutira in tako postane še bolj odporna. Čeprav ima več mehanizmov odpornosti, gre najpogosteje za mutirane proteinske porine, ki so v zunanji membrani in skozi njih prehajajo v celico snovi. Prav tako tvori več različnih  $\beta$ -laktamaz, ki inaktivirajo mnoge  $\beta$ -laktamske antibiotike (Murray in sod., 2005). Zlasti problematični so encimi MBL in encimi tipa OXA. S pojavom večjega števila, tudi proti karbapenemom, odpornih sevov se je pojavilo vprašanje ali gre za genetsko različne vrste ali za širjenje klonalne skupine. Za razjasnitev tega vprašanja se pogosto uporablja metoda MLST (Curran in sod., 2004).

Za opredelitev filogenetske povezave sevov *P. aeruginosa* se vedno pogosteje uporablja metoda MLST (ang. "multi-locus sequence typing"), ki temelji na primerjavi nukleotidnega zaporedja sedmih t.i. gospodinjskih genov (ang. "house-keeping genes"), predstavljenih v preglednici 5. Produkti gospodinjskih genov so bistveni za delovanje vsake celice, zato so pri sorodnih sevih evolucijsko ohranjeni. Seve uvrščamo v določene "sekvenčne tipe" (ST ali ang. "sequence type") na podlagi razlik v alelih in kombinacije alelov posameznih genov. S primerjavami alelnih profilov lahko ugotovljamo sorodnost med izolati, saj imajo sorodni izolati enak ali zelo podoben ST (Curran in sod., 2004).

**Preglednica 5.** Funkcija genov, ki so vključeni v analizo z MLST in njihovo mesto na genomu (Curran in sod., 2004).

Lokus	Produkt gena	Funkcija
acsA	acetil koencim A sintetaza (ACS)	encim katalizira nastanek vezi med acetatom in koencimom A v procesu glikolize
aroE	šikimat dehidrogenaza	encim katalizira eno od stopenj šikimatne poti
guaA	GMP sintetaza (GMPS)	encim katalizira aminacijo ksantozinmonofosfata v GMP
mutL	DNA "mismatch" popravilni protein	encim sistema, ki prepoznava in odpravlja nepravilnosti pri podvajanju DNA
nuoD	NADH dehidrogenaza I veriga C, D	encim se nahaja v notranji membrani mitohondrija in katalizira prenos elektronov od NADH do koencima Q (elektronska transportna veriga)
ppsA	fosfoenolpiruvat sintetaza	encim v procesu glukoneogeneze katalizira pretvorbo piruvata v fosfoenolpiruvat
trpE	antralinat sintetaza, komponenta I	encim katalizira začetne reakcije pri sintezi triptofana



#### **2.4.2 *Acinetobacter baumannii***

Na osnovi analize zaporedja genov za 16S rRNA se rod *Acinetobacter* uvršča v družino *Moraxellaceae*, red *Pseudomonadales*, razred *Gammaproteobacteria* (Garrity in sod., 2005). Najpogosteje so saprofiti, ki jih normalno najdemo v prsti, vodi, kanalizaciji in v hrani. Lahko so tudi del človeške kožne mikrobiote ali mikrobiote respiratorne poti (Garrity in sod., 2005; Todar, 2011). Čeprav so običajno nepatogeni, lahko povzročijo nekatere bolnišnične okužbe, predvsem pri bolnikih na intenzivni negi. Okužbe s to bakterijo naj bi bile povezane s časom hospitalizacije, predvsem na oddelkih za intenzivno nego, uporabo kliničnih instrumentov in predhodno uporabo antibiotikov. Kažejo se kot bakteremija, endokarditis, meningitis, pljučnica, okužbe kože in ran in okužbe urinarne poti (Cohen in sod., 2010). Bakterije iz rodu *Acinetobacter* so naravno odporne proti nekaterim skupinam protimikrobnih učinkovin in so nagnjene k nabiranju genov odpornosti v t. i. »superintegronih«. Okužbe, ki jih povzroča vrsta *A. baumannii*, je zaradi večkratne odpornosti bakterije zelo težko zdraviti. Mnogokrat so okužbe smrtne. Kot sredstvo zadnje izbire uporabljajo karbapeneme, vendar se tudi proti tem pojavlja odpornost. V zadnji letih so izbruhi bolnišničnih okužb z vrsto *A. baumannii* pogostejši (Lee in sod., 2011).

#### **2.4.3 *Escherichia coli***

Na osnovi analize zaporedja genov za 16S rRNA se rod *Escherichia* uvršča v družino *Enterobacteriaceae*, red *Enterobacteriales*, razred *Gammaproteobacteria* (Garrity in sod., 2005). Bakterija *E. coli* živi v spodnjem delu prebavila človeka in toplokrvnih živali. Bakterija je zato pokazatelj fekalne onesnaženosti vode in hrane (Kayser in sod., 2005; Todar, 2011). Večina sevov, ki so prisotni v črevesju ni patogenih in gostitelju ne povzročajo škode. Vendar lahko sevi *E. coli* pri ljudeh z oslabiljenim imunskim sistemom in sevi, ki imajo določene gene za virulentne dejavnike postanejo patogeni in povzročijo tako črevesne kot zunajčrevesne okužbe (Garrity in sod., 2005). Večina sevov vrste ima površinske strukture, ki omogočijo začetno pritrditev na gostitelja in so tako vključene v kolonizacijo gostiteljevega tkiva (Holden in Gally, 2004). Vrsta je naravno odporna proti hidrofobnim antibiotikom. S kromosomskimi mutacijami in/ali s pridobitvijo plazmidov z

geni odpornosti pa lahko sevi postanejo odporni proti različnim skupinam protimikrobnih učinkovin. Mnogo sevov tvori ESBL, zato za zdravljenje okužb s temi sevi ostaja le malo razpoložljivih protimikrobnih učinkovin (Garrity in sod., 2005).

#### **2.4.4 *Klebsiella pneumoniae***

Na osnovi analize zaporedja genov za 16S rRNA bakterijo uvrščamo v rod *Klebsiella*, družino *Enterobacteriaceae*, red *Enterobacteriales* in razred *Gammaproteobacteria* (Garrity in sod., 2005). Vrsta je ubikvitarna. Pri ljudeh je lahko del mikrobiote v ustih, v grlu in na koži, predvsem pa v prebavilu. Prisotna je tudi v vodi, v prsti in pri rastlinah (Todar, 2011). Resno težavo predstavlja pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. Okužbe s *K. pneumoniae* se večinoma pojavljajo pri ljudeh, ki se zaradi drugih bolezni zdravijo v bolnišnicah in ljudeh z oslabljenim delovanjem pljuč (Murray in sod., 2005). Primarni rezervoar bakterije je gastrointestinalna pot bolnikov, glavni vektor prenosa pa je osebje. Vir bakterije so lahko tudi kontaminirani klinični instrumenti. Najpogosteje pride do okužbe urinarne poti, povzroča pa tudi pljučnico, bakteremijo in pri prezgodaj rojenih otrocih neonatalno sepso. Visoka stopnja kolonizacije pri bolnikih je povezana z uporabo antibiotikov. Sevi so naravno odporni proti nekaterim penicilinom (ampicilin in karbencilin) (Garrity in sod., 2005). S pridobitvijo plazmidnov z zapisi za odpornost so postali odporni proti večini  $\beta$ -laktamov. Veliko sevov je zelo virulentnih, se hitro širijo in imajo zapis za ESBL. Za zdravljenje okužb s sevi, ki tvorijo ESBL, zaradi vse večjega števila proti kinolonom odpornih izolatov ostajajo učinkoviti le še karbapenemi (Walther-Rasmussen in Høiby, 2007).

## 2.5 DETEKCIJA GENOV ZA KARBAPENEMAZE

Za izbiro primernega zdravljenja in za izvajanje nadzora nad okužbami z bakterijami, ki tvorijo karbapenemaze, je zelo pomembna detekcija bakterij v kliničnih laboratorijih. Odkrivanje bakterij z zapisi za te encime je težavno, saj jih ni mogoče določiti le na podlagi fenotipske odpornosti. Lahko se postavi celo napačna diagnoza in posledično napačna terapija, ki lahko vodi v poslabšanje zdravstvenega stanja bolnika. Uporaba neustreznih terapevtskih učinkovin pa vodi v selekcijo proti protimikrobnim učinkovinam odpornih sevov (Miriagou in sod., 2010).

### 2.5.1 Fenotipske metode

Za detekcijo bakterij, ki tvorijo karbapenemaze, se najpogosteje uporablja modificirani Hodge-ov test (MHT). Temelji na inaktivaciji karbapenema z bakterijsko kulturo ali s celičnim izločkom bakterij, ki tvorijo karbapenemaze. Test je zanesljiv za detekcijo mehanizma odpornosti, vendar nam ne daje informacije o tipu karbapenemaze, ki je vključena. Prav tako ga lahko napačno interpretiramo v primeru encimov z nizko aktivnostjo, kot so MBL pri enterobakterijah (Miriagou in sod., 2010).

Za specifično detekcijo bakterij, ki tvorijo MBL so razvili teste na osnovi inhibicije (izkoristijo značilnost metaloencimov, da za aktivnost potrebujejo cinkove ione in tako s kelatorji zavrejo hidrolizo  $\beta$ -laktamov). Temeljijo na sinergiji med inhibitorji MBL (to so npr. EDTA, EDTA+fenantrolin, tiolne komponente, dipikolinska kislina) in karbapenemom ali oksiminocefalosporinom (ceftazidim). Med tovrstne teste uvrščamo test dvojnega diska in test kombiniranih diskov (Miriagou in sod., 2010). Na sinergiji med EDTA in imipenemom temelji tudi E-test MBL za detekcijo MBL pri sevih vrste *P. aeruginosa*. Ena polovica traka je prepojena z gradientom imipenema, druga polovica pa z gradientom imipenema in konstantne koncentracije EDTA (Walsh in sod., 2002). Slabosti testa so, da lahko zaradi lastne dejavnosti EDTA pri vrsti *P. aeruginosa* in *A. baumannii* dobimo lažno pozitivne rezultate (Health Protection Agency in ARHAI, 2011). Test za detekcijo sevov enterobakterij (predvsem *K. pneumoniae*), ki tvorijo KPC in

MBL, je zasnovan na inhibitornem učinku borovih kislin, običajno 3-aminofenilborove kisline (Pasteran in sod., 2009), dipikolinske kisline in kloksacilina (Giske in sod., 2011).

### 2.5.2 Genotipske metode

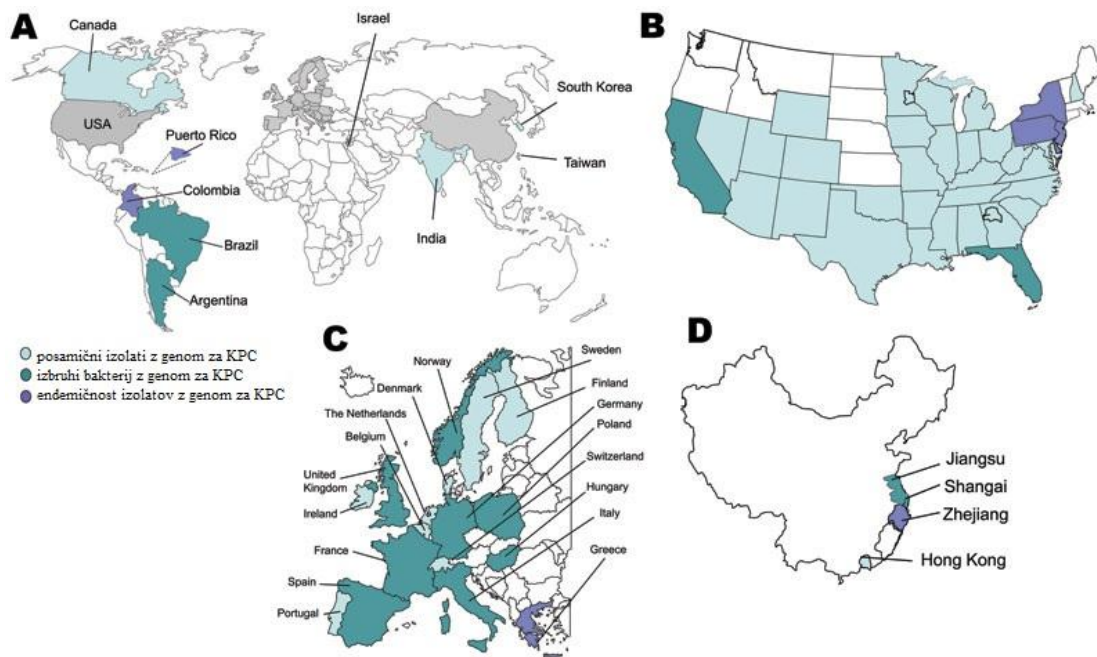
Kadar pri bakterijah obstaja sum na prisotnost karbapenemaz je najhitrejša in najzanesljivejša pot dokaz karbapenemaznih genov. To največkrat naredimo z molekularno metodo PCR (ang. "polymerase-chain reaction"), pri kateri pomnožimo gene za karbapenemaze. Za dokončno opredelitev je potrebno določiti še nukleotidno zaporedje pomnoženega gena. Glavne pomanjkljivosti genetskih tehnik za odkrivanje prisotnosti  $\beta$ -laktamaz so finančni stroški, nezmožnost detekcije novih genov in pomanjkanje izobraževanja osebja na tem področju. Ker se determinante odpornosti proti karbapenemom vedno bolj širijo, je nujno potreben cenovno dostopen, hiter, občutljiv in zanesljiv specifičen test za odkrivanje karbapenemazne aktivnosti (Miriagou in sod., 2010; Nordmann in sod., 2011).

## 2.6 GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST NAJPOMEMBNEJŠIH KARBAPENEMAZ

O pridobljenih karbapenemazah pri po Gramu negativnih bakterijah, ki povzročajo bolnišnične in zunajbolnišnične okužbe, vedno pogosteje poročajo iz vsega sveta. Klinično zaskrbljujoči encimi so predvsem iz družine IMP in VIM pri *P. aeruginosa* in enterobakterijah ter oksacilinaze pri *A. baumannii* (OXA-23, -40 in -58) in *K. pneumoniae* (OXA-48). Gen *bla*<sub>KPC</sub> je v največji meri prisoten pri *K. pneumoniae*, občasno pa tudi pri drugih enterobakterijah. Pri teh bakterijah je široko razširjen tudi NDM-1 (Health Protection Agency in ARHAI, 2011).

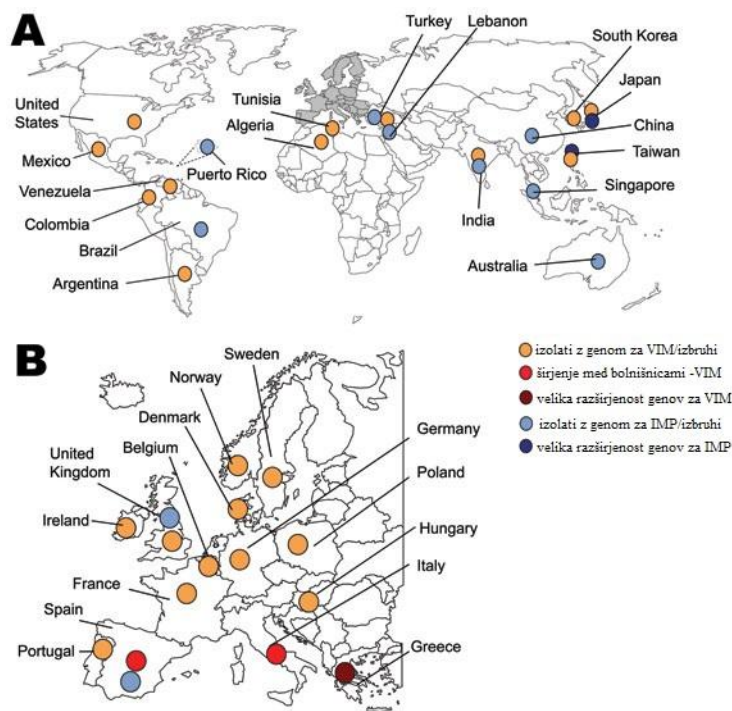
Gen *bla*<sub>KPC-1</sub> so prvič odkrili leta 1996, pri vrsti *K. pneumoniae* (Yigit in sod., 2001). Encimi KPC so klinično najpogostejši encimi razreda A, saj imajo največji potencial za razširitev glede na to, da je njihov zapis na plazmidih. Prisotne so predvsem pri kliničnih izolatih vrste *K. pneumoniae*, redkeje pri *E. coli*, drugih enterobakterijah in vrsti *P. aeruginosa* (Queenan in Bush, 2007). V nekaj letih od odkritja prve KPC, so se

bakterije, ki sintetizirajo te encime, razširile po vsem svetu (slika 2). O njih poročajo iz ZDA, Portorika, Kolumbije, Grčije, Izraela in Kitajske. O pojavu bakterij, ki tvorijo encime KPC so poročali tudi v drugih državah Evrope in Južne Amerike (Nordmann in sod., 2009). V Slovenji bakterij, ki tvorijo KPC, do začetka naše raziskave, še niso zasledili.



**Slika 2.** Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo KPC. A) svetovna razširjenost; B) razširjenost v ZDA; C) razširjenost v Evropi; D) razširjenost na Kitajskem (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>).

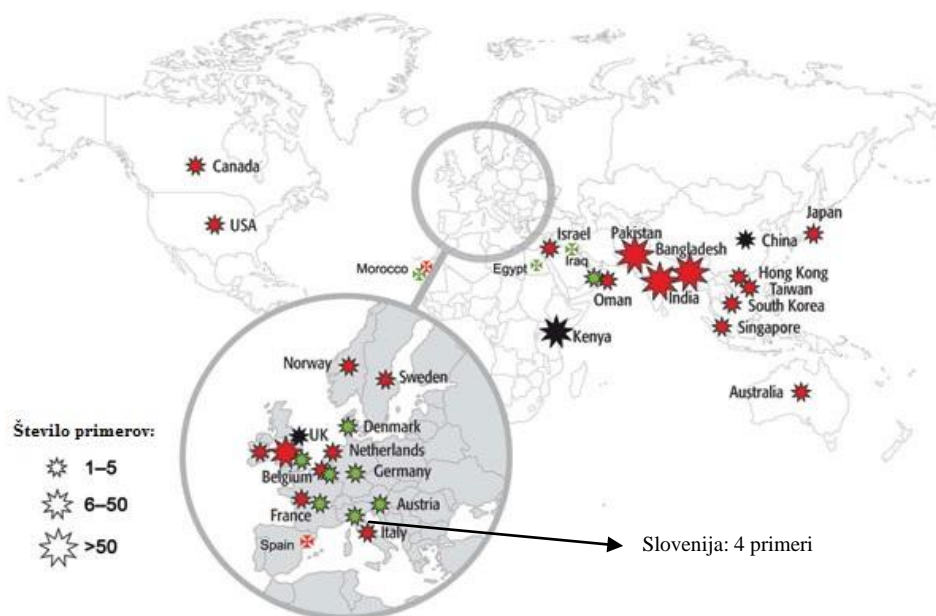
Med encimi razreda B predstavljajo največjo skrb in grožnjo karbapenemaze IMP, VIM (Queenan in Bush, 2007) in NDM-1 (Nordmann in sod., 2011<sup>b</sup>). Gen *bla*<sub>IMP-1</sub> so prvič identificirali pri izolatu vrste *P. aeruginosa*, izoliranem leta 1988 na Japonskem (Watanabe in sod., 1991). Gen *bla*<sub>VIM-1</sub> pa so prvič odkrili leta 1997, prav tako pri vrsti *P. aeruginosa* (Lauretti in sod., 1999). Endemično se pojavljajo encimi IMP in VIM v Grčiji, na Tajskem in Japonskem, čeprav so o posameznih pojavih in izbruhih poročali v mnogih državah (slika 3) (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>). MBL se najpogosteje pojavljajo pri enterobakterijah (predvsem *K. pneumoniae*, redkeje *E. coli*), *P. aeruginosa* in *A. baumannii* (Walsh in sod., 2005). V Slovenji o pojavu bakterij, ki tvorijo IMP in VIM, do začetka naše raziskave še niso poročali.



**Slika 3.** Svetovna (A) in evropska (B) geografska razširjenost enterobakterij, ki producirajo VIM in IMP (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>).

V središču pozornosti so trenutno enterobakterije, ki imajo zapis za gen *bla*<sub>NDM-1</sub>. Gen za NDM-1 so prvič odkrili leta 2008 pri vrsti *K. pneumoniae* in *E. coli* (Yong in sod., 2009). Od sredine leta 2010 so o odkritju bakterij, ki tvorijo encim NDM-1, poročali iz vseh svetovnih kontinentov, razen Osrednje in Južne Amerike (slika 4). Večina pozitivnih izolatov je bila odkrita pri bolnikih, ki so obiskali ali bili prepeljani iz območja Indije in Pakistana. Nedavne raziskave pa kažejo, da bi lahko bile balkanske države in države Bližnjega Vzhoda sekundarni rezervoar bakterij, ki tvorijo NDM-1. Encim je bil identificiran pri vrsti *K. pneumoniae*, *E. coli* (Kumarasamy in sod., 2010; Nordmann in sod., 2011<sup>b</sup>), *A. baumannii* (Kasse in sod., 2011; Pirš in sod., neobjavljeni podatki) in nedavno v Srbiji pri vrsti *P. aeruginosa* (Jovcic in sod., 2011). Bakterije, ki tvorijo NDM-1, so zasledili tudi že v sosednji Italiji, Avstriji in na Hrvaškem (Gaibani in sod., 2011; Zarfel in sod., 2011; Mazzariol in sod., 2012). V Sloveniji smo do sedaj odkrili 4

primere bakterij, ki tvorijo NDM-1 (3 izolati vrste *K. pneumoniae* in 1 izolat vrste *A.baumannii*) (neobjavljeni podatki).

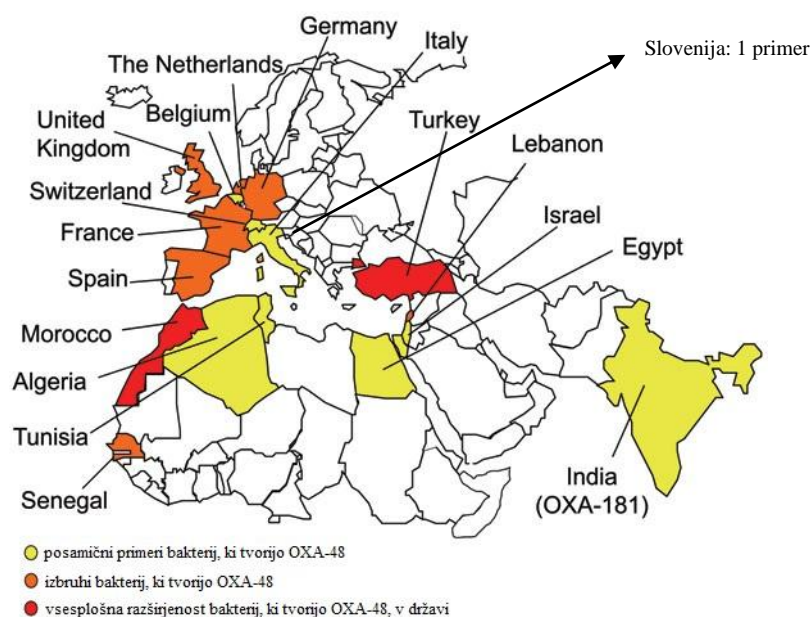


**Slika 4.** Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo NDM-1. Velikost zvezdic predstavlja število primerov NDM-1, o katerih so poročali. Rdeče zvezdice predstavljajo okužbe, ki izhajajo iz Indije, Pakistana ali Bangladeša; zelene zvezdice predstavljajo okužbe, ki izhajajo iz balkanskih držav ali Bližnjega Vzhoda; črne zvezdice so okužbe neznanega izvora (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>).

OXA-48 so prvič odkrili in identificirali pri sevu *K. pneumoniae* leta 2003 v Turčiji (Poirel in sod., 2004). Od takrat so v tej državi poročali o več izbruhih bolnišničnih okužb z bakterijami, ki tvorijo te encime. Bakterije, ki imajo zapis za encim OXA-48, so razširjene v evropskih državah, vzhodnem in južnem delu Sredozemlja in v Afriki (slika 5) (Poirel in sod., 2004), ni pa nobenega poročila o teh bakterijah v ZDA in Kanadi. Encim OXA-48 tvorijo predvsem sevi *K. pneumoniae* in *E. coli* (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>).

Pirš in sodelavci (2011) poročajo o prvem dokumentiranem primeru vrste *K. pneumoniae*, ki tvori OXA-48, v Sloveniji. Sev so izolirali pri bolniku, ki je bil v Slovenijo prepeljan iz Libije, vendar ne neposredno iz bolnišnice. Konec oktobra 2011 je Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) izdal opozorilo za bolnike, prepeljane iz

Libije, saj bi naj predstavljali večje tveganje vnosa večkratno odpornih bakterij. Slovenski Nacionalni inštitut za javno zdravstvo je zato izdal opozorilo in priporočilo, da se vse bolnike, prepeljane iz Libije, testira za prisotnost večkratno odpornih po Gramu negativnih bakterij. Izolat, pozitiven za prisotnost OXA-48, je bil odporen proti vsem  $\beta$ -laktamom, vključno s karbapenemi (Pirš in sod., neobjavljeno).



**Slika 5.** Geografska razširjenost bakterij, ki tvorijo karbapenemaze tipa OXA-48 (Nordmann in sod., 2011<sup>a</sup>).

Pirš in sodelavci so z retrospektivno študijo analizirali širjenje proti karbapenemom odporne bakterije *A. baumannii* v osrednji ljubljanski bolnišnici med leti 2005 in 2010. Delež proti karbapenemom odporne vrste *A. baumannii* je med leti 2005 in 2007 znašal manj kot 1 %, leta 2008 že 5,3 % in 2009 15,5 %. Raziskava je nakazala možen izbruh proti karbapenemom odporne vrste *A. baumannii* med letoma 2008 in 2009. Pri 7 izolatih so potrdili prisotnost gena  $bla_{OXA-58}$  in pri 5 izolatih prisotnost gena  $bla_{OXA-40}$  (Pirš in sod., neobjavljeno).



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

###### 3.1.1.1 Klinični izolati

V diplomskem delu smo analizirali 67 fenotipsko proti karbapenemom odpornih kliničnih sevov, ki smo jih dobili z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Od 31 sevov, ki so bili identificirani kot *P. aeruginosa*, so jih 17 izolirali pri bolnikih brez cistične fibroze in 14 pri bolnikih s cistično fibrozo. 32 sevov je bilo identificiranih kot *K. pneumoniae* in 4 sevi kot *E. coli*. Podatki o sevih so navedeni v preglednici 1 v prilogi A.

Z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo smo dobili tudi dva respiratorna izolata (*A. baumannii* in *K. pneumoniae*) in en urinarni izolat (*K. pneumoniae*). Vsi 3 bakterijski sevi so imeli zapis za gen  $bla_{NDM-1}$ . Izolirane seve smo nacepili v več serijah (glej prilogo A, preglednica 2).

###### 3.1.1.2 Laboratorijski sevi

Laboratorijski sev *E. coli* J53 Az<sup>f</sup>, ki smo ga uporabili pri konjugaciji, je iz zbirke sevov Skupine za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Kontrolni sev NCTC 13443 (*K. pneumoniae*) je last Skupine za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani in je bil kupljen pri NCTC – National Collection of Type Cultures (<http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp>).

### 3.1.2 Gojišča

#### 3.1.2.1 Priprava gojišč *Luria-Bertani (LB)*

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 20 g/l gojišča LB, 5 g/l NaCl in 15 g/l agarja. Raztopino smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na približno 55 °C, smo ga vlili v sterilne plastične petrijevke in pustili, da se strdi.

Za pripravo trdnih gojišč LB z dodano protimikrobno učinkovino smo osnovno gojišče pripravili po zgoraj opisanem postopku. Raztopini, ohlajeni na 55 °C, smo sterilno dodali želeno protimikrobno učinkovino do končne koncentracije, ki je navedena v preglednici 6.

Za pripravo tekočih gojišč LB z dodano protimikrobno učinkovino smo v deionizirani vodi raztopili 20 g/l gojišča LB in 5 g/l NaCl. V sterilne 500-ml erlenmajerice smo razlili po 150 ml gojišča in jih zatisnili s čepi. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Pustili smo, da so se ohladila na približno 55 °C in jim nato sterilno dodali želeno protimikrobno učinkovino do končne koncentracije, ki je navedena v preglednici 6.

**Preglednica 6.** Založna in končna koncentracija protimikrobnih učinkovin v gojišču LB.

<b>Protimikrobna učinkovina</b>	<b>Založna koncentracija (mg/ml)</b>	<b>Končna koncentracija (µg/ml)</b>
ampicilin	100	110
ceftazidim	60	30
cefotaksim	10	2
natrijev azid	160	170

#### 3.1.2.2 Priprava tekočih gojišč *BHI (brain-heart infusion)*

Tekoče gojišče BHI smo pripravili tako, da smo v deionizirani vodi raztopili 35 g/l gojišča BHI. V sterilne 150-ml erlenmajerice smo razlili po 30 ml gojišča in jih zatisnili s čepi. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C in nato pustili, da so se ohladila.

### 3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč HA (hranilni agar)

Za pripravo trdnih gojišč HA smo v deionizirani vodi raztopili 8 g/l gojišča HA, 5 g/l in 15 g/l agarja in ga avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke in pustili, da se je strdilo.

### 3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč KA (krvni agar)

Gojišče krvni agar smo pripravili kot osnovno gojišče, opisano v odstavku 3.1.2.3. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na 55 °C smo mu dodali govejo kri (5 ml na 100 ml gojišča), gojišče razlili v sterilne plastične petrijevke in pustili, da se strdi. Za pripravo selektivnega gojišča smo raztopini po dodatku krvi dodali še protimikrobno učinkovino.

Vsa pripravljena gojišča smo do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

## 3.1.3 Kemikalije

### BIOLIFE ITALIANA

- agar;
- BHI;
- HA.

### FERMENTAS

- "PCR Master Mix" #K0171 (0,05 enot/μl *Taq* polimeraze DNA v reakcijskem pufu: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP));
- "Dream Taq Green PCR Master Mix" #K1081 (0,05 enot/μl *Taq* polimeraze DNA v reakcijskem pufu: 2x Dream Taq Green buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP));
- standardna DNA-lestvica "1 kb DNA Ladder" #SM0311/2/3;
- standardna DNA-lestvica "1 kb Plus DNA Ladder" #SM1331/2/3;
- standardna DNA-lestvica "100 bp DNA Ladder" #SM0241/2/3;
- standardna DNA-lestvica "50 bp DNA Ladder" #SM0371/2/3;

- destilirana voda brez nukleaz #R0581;
- nanašalni elektroforezni pufer 6×;
- komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela "GeneJet™ Gel Extraction Kit";
- pufer 10× FastDigest Buffer.

#### KEMIKA

- EDTA.

#### MERCK

- izopropanol;
- 96 % etanol;
- 80 % etanol;
- natrijev klorid.

#### QIAGEN:

- komplet za izolacijo plazmidne DNA "QIAGEN® Plasmid Midi Kit (100)"

#### RIEDEL DE HAËN:

- borova kislina.

#### ROTH:

- baza Tris.

#### SIGMA:

- agaroz (agaroz za rutinsko uporabo);
- ampicilin;
- ceftazidim;
- cefotaksim;
- etidijev bromid;
- LB;
- natrijev azid.

### 3.1.4 Encimi

FERMENTAS:

- *Pst*I;
- FastDigest<sup>®</sup> *Pst*I;
- FastDigest<sup>™</sup> *Hind*III;
- *Xho*I;
- *Xba*I.

### 3.1.5 Pufri, raztopine in reagenti

Za pripravo pufrov in raztopin smo najprej natehtali suhe snovi, jih prenesli v čaše ustrezne velikosti in jih raztopili. Do ustreznega volumna smo dopolnili z destilirano vodo. Kjer je bilo potrebno smo umerili pH, ko so bile snovi raztopljene in preden smo dolili vodo.

- pufer 5× TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA):
  - baza Tris 54 g
  - borova kislina 27,5 g
  - 0,5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml

Z destilirano vodo smo dopolnili do oznake 1000 ml. Pred uporabo smo pufer 5× redčili z destilirano vodo.

- pufer TE:
  - Tris/HCl (pH 8.0) 10 mM
  - EDTA (pH 8.0) 1 mM

Raztopino smo avtoklavirali.

- 0,5 M EDTA (pH 8.0):
  - EDTA 93,6 mg
  - dH<sub>2</sub>O do 500 ml

Z 10 mM NaOH smo uravnotežili pH na 8.0.

- etidijev bromid (10 mg/ml)
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25-odstotni bromofenol modro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza).

### **3.1.6 Začetni oligonukleotidi**

Začetni oligonukleotidi so bili pripravljeni v podjetju Jena Bioscience GmbH, Jena, Nemčija.

### **3.1.7 Kompleti**

#### *3.1.7.1 Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela*

Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela, "GeneJET™ Gel Extraction Kit" #K0692 (Fermentas), vsebuje:

- raztopino "Binding Buffer",
- raztopino "Wash Buffer",
- raztopino "Elution Buffer".

#### *3.1.7.2 Komplet za izolacijo plazmidne DNA*

Komplet za izolacijo plazmidne DNA, "QIAGEN® Plasmid Midi Kit (100)" (QIAGEN), vsebuje:

- raztopino "Buffer P1",
- raztopino "Buffer P2",
- raztopino "Buffer P3",
- raztopino "Buffer QBT (equilibration buffer)",
- raztopino "Buffer QC (wash buffer)",
- raztopino "Buffer QF (elution buffer)",
- kolone "QIAGEN-tip 100".

### 3.1.8 Pribor in oprema

Pri delu smo uporabili naslednjo opremo:

- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer),
- ciklični termostat Biometra<sup>®</sup> UNO II,
- ciklični termostat BIO-RAD MyCycler<sup>™</sup> thermal cycler,
- namizna centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417C),
- namizna centrifuga (Eppendorf Centrifuge 29571 MiniSpin Plus),
- centrifuga (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen),
- centrifuga (Sorvall<sup>®</sup> Superspeed RC2-B Automatic Refrigerated Cetrifuge),
- transiluminator (BIO View UV-light UXDT-20ML-15R),
- sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma),
- avtomatske pipete (Eppendorf),
- nastavki z različnim volumnom za avtomatske pipete,
- stresalnik,
- vibracijski mešalnik (SBD),
- laboratorijske rokavice za enkratno uporabo,
- laboratorijska steklovina: čaše, merilni valji, erlenmajerice, ...
- cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl),
- steklena Drigalski spatula za razmaz,
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- mikrocentrifugirke za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) – 200 µl (MicroAmp, Perkin Elmer),
- centrifugirke,
- plastične petrijevke,
- magnetno mešalo (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- tehtnica (KERN<sub>PFB</sub>),
- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- plinski gorilnik (Tlos, Zagreb, Hrvaška).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Fenotipske metode

#### 3.2.1.1 Izolacija in identifikacija sevov

Fenotipska identifikacija kliničnih sevov je bila narejena na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in na Zavodu za zdravstveno varovanje Maribor.

### 3.2.2 Genotipske metode

#### 3.2.2.1 Priprava matrične DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

##### 3.2.2.1.1 Priprava bakterijskih lizatov v vodi

Iz trdnega gojišča smo v 1,5-ml mikrocentrifugirko prenesli eno cepilno zanko bakterijske kulture in dodali 200 µl sterilne destilirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Nato smo resuspendirane celice 10 minut segrevali v vreli vodi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 14.000 obr./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. 150 µl čistega supernatanta smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko. Supernatant, v katerem je celokupna celična DNA, smo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

##### 3.2.2.1.2 Priprava bakterijskih lizatov v pufru TE

V 1,5-ml mikrocentrifugirko smo najprej odpipetirali 200 µl pufru TE, pH 8. Nato smo iz trdnega gojišča v pufer prenesli eno cepilno zanko bakterijske kulture. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Resuspendirane celice smo nato 5 minut segrevali v vreli vodi in jih potem centrifugirali 5 minut pri 14.000 obr./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. 150 µl čistega supernatanta smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko. 15 µl supernatanta smo dodatno razredčili v 100 µl pufru TE. Celokupno DNA v tem razredčenem supernatantu smo uporabili kot matrično DNA za reakcijo PCR.



### 3.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

#### 3.2.2.2.1 Sestava reakcijskih mešanic za PCR

Pri reakcijah PCR smo uporabili "PCR Master Mix" ali "Dream Taq Green PCR Master Mix". Kot matrično DNA smo v teh reakcijah uporabili bakterijski lizat v vodi in/ali bakterijski lizat v pufri TE.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje karbapenemaznih genov razreda A (*bla*<sub>NMC</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, *bla*<sub>KPC-1</sub>, *bla*<sub>GES</sub>), razreda B (*bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>RGIM-1</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, *bla*<sub>DIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>) in razreda D (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-50</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-60</sub>, *bla*<sub>OXA-69</sub>) smo pripravili tako, da smo v 200- $\mu$ l mikrocentrifugirko odpipetirali po 1  $\mu$ l obeh začetnih oligonukleotidov za posamezen gen, 12,5  $\mu$ l "Dream Taq Green PCR Master Mix-a" (Fermentas), 8,5  $\mu$ l destilirane vode in po 2  $\mu$ l posameznega bakterijskega lizata DNA.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje "gospodinjskih" genov *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* in *trpE* smo pripravili tako, da smo v 200- $\mu$ l mikrocentrifugirko odpipetirali 4  $\mu$ l matrične DNA bakterijskega lizata MB3, po 2  $\mu$ l obeh začetnih oligonukleotidov za posamezen gospodinjski gen, 25  $\mu$ l "PCR Master Mix-a" (Fermentas) in 17  $\mu$ l destilirane vode.

Za pomnoževanje integrona pri bakterijskem lizatu MB3 (ima zapis za *bla*<sub>VIM-1</sub>) smo v 200- $\mu$ l mikrocentrifugirko odpipetirali 2  $\mu$ l bakterijskega lizata MB3, po 2  $\mu$ l začetnih oligonukleotidov INT 3'-CS in INT 5'-CS, 12,5  $\mu$ l "PCR Master Mix-a" (Fermentas) in 6,5  $\mu$ l destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2 (multipleks PCR) smo pripravili tako, da smo v 200- $\mu$ l mikrocentrifugirko odpipetirali po 1  $\mu$ l začetnih oligonukleotidov, 12,5  $\mu$ l "Dream Taq Green PCR Master Mix-a" (Fermentas), 4,5  $\mu$ l destilirane vode in 2  $\mu$ l lizata domnevne transkonjugante (preglednica 9).

### 3.2.2.2.2 Začetni oligonukleotidi in razmere pomnoževanja z reakcijo PCR

V preglednici 7 so navedeni začetni oligonukleotidi, ki smo jih izbrali za pomnoževanje genskih zapisov in smo jih uporabili pri reakciji PCR, PCR-program in velikost pričakovanega pomnožka. V preglednici 8 so navedeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje t. i. gospodinjskih genov (MLST) pri vrsti *P. aeruginosa*, PCR-program in velikost pričakovanega pomnožka.

**Preglednica 7.** Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, PCR program in velikost pomnožka PCR.

Gen	Začetni oligonukleotid (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	PCR-program	Pomnožek (bp)	Referenca	
<b>Karbapenemaze iz razreda A</b>					
<i>bla</i> <sub>NMC-A</sub>	NMC-1 (GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA) NMC-4 (CGGGTGATAAAATCACACTGAGCATA)	95 °C – 4 min	1×	2158	Radice in sod., 2004
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 3 min			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>SME</sub>	SME-5 (AGATAGTAAATTTATAG) SME-6 (CTCTAACGCTAATAG)	95 °C – 4 min	1×	1138	Queenan in sod., 2000
		94 °C – 30 s			
		40 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 90 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>IMI</sub>	IMI-A (ATAGCCATCCTTGTTTAGCTC) IMI-B (TCTGCGACTTTATCCTC)	95 °C – 4 min	1×	818	Aubron in sod., 2005
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 70 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC F (ATGTCACTGTATCGCCGTCT) KPC R (TTTTAGAGCCTTACTGCCC)	95 °C – 4 min	1×	893	Bradford in sod., 2004
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 70 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES-C (GTTTTGCAATGTGCTCAACG) GES-D (TGCCATAGCAATAGGCGTAG)	95 °C – 4 min	1×	371	Weldhagen in Prinsloo, 2004
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 90 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<b>Metalocimi iz razreda B</b>					
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	IMP-1 F (TGAGCAAGTTATCTGTATTC) IMP-1 R (TTAGTTGCTTGTTTTGATG)	95 °C – 4 min	1×	740	Yan in sod., 2001
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 70 s			
		72 °C – 7 min	1×		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje **Preglednice 7.** Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, PCR-program in velikost pomnožka PCR.

Gen	Začetni oligonukleotid (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	PCR-program		Pomnožek (bp)	Referenca
<i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	IMP-2 F (GGCAGTCGCCCTAAAACAAA) IMP-2 R (TAGTTACTTGGCTGTGATGG)	95 °C – 4 min	1×	737	
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	VIM-1 F (TTATGGAGCAGCAACCGATGT) VIM-1 R (CAAAAAGTCCCCTCCAACGA)	95 °C – 4 min	1×	920	Yan in sod., 2001
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 70 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	VIM-2 F (AAAGTTATGCCGCACTCACC) VIM-2 R (TGCAACTTCATGTTATGCCG)	95 °C – 4 min	1×	865	
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 70 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	SPM-1 F (CCTACAATCTAACGGCGACC) SPM-1 R (TCGCCGTGTCCAGGTATAAC)	95 °C – 4 min	1×	650	
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		Castanheira in sod., 2004
<i>bla</i> <sub>RGIM-1</sub>	RGIM-1 F (AGAACCTTGACCGAACGCAG) RGIM-1 R (ACTCATGACTCCTCAGGAGG)	95 °C – 4 min	1×	748	
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>SIM-1</sub>	SIM-1 F (TACAAGGGATTTCGGCATCG) SIM-1 R (TAATGGCCTGTTCCCATGTG)	95 °C – 4 min	1×	571	Lee in sod., 2005
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 45 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>DIM-1</sub>	DIM-1 A (TCTATTCAGCTTGTCTTCGC) DIM-1 B (TGTTAGAGGCTGTCTCAGCC)	95 °C – 4 min	1×	688	Poirel in sod., 2010
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	NDM-1 F (GGGCAGTCGCTCCAACGGT) NDM-1 R (GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT)	95 °C – 5 min	1×	475	Woodford, neobjavljeno
		94 °C – 30 s			
		60 °C – 30 s	30×		
		74 °C – 45 s			
		74 °C – 10 min	1×		
<b>Oksacilinaze iz razreda D</b>					
Sg.1 <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	OXA-23 P5 (AAGCATGATGAGCGCAAAG) OXA-23 P6 (AAAAGGCCCATTTATCTCAAA)	95 °C – 4 min	1×	1066	Donald in sod., 2000
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 90 s			
		72 °C – 7 min	1×		

Se nadaljuje.

Nadaljevanje **Preglednice 7.** Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje, PCR-program in velikost pomnožka PCR.

Gen	Začetni oligonukleotid (nukleotidno zaporedje 5' → 3')	PCR-program		Pomnožek (bp)	Referenca
Sg. 2 <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	OXA-24 F (GTACTAATCAAAGTTGTGAA) OXA-24 R (TTCCCTAACATGAATTTGT)	95 °C – 4 min	1×	1023	Afzal-Shah in sod., 2001
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 90 s			
		72 °C – 7 min	1×		
Sg. 3 <i>bla</i> <sub>OXA-69</sub>	OXA-69 A (CTAATAATTGATCTACTCAAG) OXA-69 B (CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC)	95 °C – 4 min	1×	975	Heritier in sod., 2005 <sup>a</sup>
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 90 s			
		72 °C – 7 min	1×		
Sg. 4 <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	OXA-58 A (TTATCAAAAATCCAATCGGC) OXA-58 B (TAACCTCAAACCTTCTAATTC)	95 °C – 4 min	1×	934	Heritier in sod., 2005 <sup>b</sup>
		94 °C – 30 s			
		50 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
Sg. 6 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48 A (TTGGTGGCATCGATTATCGG) OXA-48 B (GAGCACTTCTTTGTGATGGC)	95 °C – 4 min	1×	744	Poirel in sod., 2004
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
Sg. 7 <i>bla</i> <sub>OXA-50</sub>	OXA-50 S (AATCCGGCGCTCATCCATC) OXA-50 AS (GGTCGGCGACTGAGGCGG)	95 °C – 4 min	1×	869	Girlich in sod., 2004 <sup>a</sup>
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
Sg. 8 <i>bla</i> <sub>OXA-60</sub>	OXA-60 A (AAAGGAGTTGTCTCATGCTGTCTCG) OXA-60 B (AACCTACAGGCGCGCTCTCACGGTG)	95 °C – 4 min	1×	848	Girlich in sod., 2004 <sup>b</sup>
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 60 s			
		72 °C – 7 min	1×		
<b>Integron</b>					
Integron PCR	INT 5'-CS (GGCATCCAAGCAGCAAG) INT 3'-CS (AAGCAGACTTGACCTGA)	95 °C – 4 min	1×	variira	Levesque in sod., 1995
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		72 °C – 3 min			
		72 °C – 7 min	1×		
<b>Filogenetske skupine</b>					
<i>chuA</i>	ChuA1 (GACGAACCAACGGTCAGGAT)			279	
	ChuA2 (TGCCGCCAGTACCAAAGACA)				
<i>yjaA</i>	YjaA1 (TGAAGTGTGACGAGACGCTG) YjaA2 (ATGGAGAATGCGTTCTCAAC)	95 °C – 5 min	1×	211	Clermont in sod., 2000
		94 °C – 30 s			
		55 °C – 30 s	30×		
		74 °C – 30 s			
TspE4.C2	TspE4.C2-F (GAGTAATGTGCGGGCATTCA) TspE4.C2-R (CGCGCCAACAAAGTATTACG)	74 °C – 10 min	1×	152	

**Preglednica 8.** Začetni oligonukleotidi za MLST pri bakteriji *P. aeruginosa*, PCR-program in velikost pomnožka PCR (Curran in sod., 2004).

Gen	Začetni oligonukleotid (nukleotidno zaporedje 5' → 3')		PCR-program	Pomnožek (bp)
	Vodilni	Povratni		
<i>acsA</i>	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	95 °C – 4 min 1× 94 °C – 30 s 55 °C – 30 s 30× 72 °C – 3 min 72 °C – 7 min 1×	842
<i>aroE</i>	TGGGGCTATGACTGGAAACC	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA		825
<i>guaA</i>	CGGCCTCGAACGTGTGGATGA	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA		940
<i>mutL</i>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC		940
<i>nuoD</i>	ACCGCCACCCGTA CTG	TCTCGCCCATCTTGACCA		1042
<i>ppsA</i>	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	GGGTCTCTTCTCCGGCTCGTAG		989
<i>trpE</i>	GCGGCCAGGGTCGTGAG	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT		811

### 3.2.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Z elektroforezo na agaroznih gelih smo preverjali prisotnost in velikost nastalih pomnožkov PCR oziroma fragmentov DNA. Glede na pričakovano velikost analiziranih fragmentov DNA smo pripravili gele z gostoto 0,9–1,5 % agaroze. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezni količini agaroze dodali pufer 1× TBE ter v mikrovalovni pečici segrevali toliko časa, da se je agarozna popolnoma raztopila. Do končnega, označenega volumna, smo dolili destilirano vodo. Za detekcijo fragmentov DNA smo gelu, ohlajenemu približno na 50 do 60 °C, dodali etidijev bromid do končne koncentracije v gelu 0,5 µg/ml. Gel smo nato vlili v nosilec s primernim glavnikom za jamice in počakali, da se je strdil. Ko smo odstranili glavnik, smo strjen gel prenesli v elektroforezno banjico in ga prelili s pufrom 1× TBE.

Kot označevalec velikosti smo v začetno in končno jamico dodali ustrezno standardno lestvico linearnih fragmentov DNA (Fermentas). V preostale jamice smo vnesli po 5 µl pomnožkov PCR (kadar smo uporabili "Dream Taq Green PCR Master Mix", ki že ima dodano barvilo). Kadar smo uporabili "PCR Master Mix" smo vzorec PCR predhodno zmešali z barvilom (nanašalni elektroforezni pufer) v razmerju 5 : 1 in ga šele nato vnesli v jamico na gelu. Elektroforezno banjico smo priključili na električno napetost. Običajno smo ločevali pri napetosti 10 V/cm gela.

Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in slikali. S primerjavo hitrosti potovanja fragmentov izbrane standardne lestvice in pomnožkov PCR smo ugotovili njihovo približno velikost.

Uporabljene standardne DNA-lestvice:

- standardna DNA-lestvica "1 kb DNA Ladder" #SM0311/2/3 - zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250.
- standardna DNA-lestvica "1 kb Plus DNA Ladder" #SM1331/2/3 - zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 20000, 10000, 7000, **5000**, 4000, 3000, 2000, **1500**, 1000, 700, **500**, 400, 300, 200, 75.
- standardna DNA-lestvica "100 bp DNA Ladder" #SM0241/2/3 - zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100.
- standardna DNA-lestvica "50 bp DNA Ladder" #SM0371/2/3 - zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100, 50.

#### 3.2.2.4 Čiščenje fragmenta, dobljenega v reakciji PCR in ugotavljanje njegovega nukleotidnega zaporedja

Pomnožke PCR določenega gena smo s sterilnim skalpelom izrezali in jih nato očistili s pomočjo kompleta za izolacijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela ("GeneJET™ Gel Extraction Kit") po navodilih proizvajalca. Očiščene fragmente smo v nekaterih primerih uporabili kot matrično DNA za ponovno reakcijo PCR (da povečamo količino produkta), ki smo jo ponovili po že opisanih postopkih (glej poglavje 3.2.2.2), le da smo tokrat podvojili količino reakcijske mešanice. Očiščene fragmente smo poslali v Macrogen inc. (Seoul, Koreja), kjer so določili njihovo nukleotidno zaporedje.

#### 3.2.2.5 Genotipska identifikacija na podlagi nukleotidnega zaporedja gena

S pomočjo spletnega programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) smo analizirali dobljena nukleotidna zaporedja.

### 3.2.2.6 *Uvrstitev seva P. aeruginosa z oznako MB3 v sekvenčno skupino na osnovi MLST*

Potem, ko smo pri vzorcu MB3 potrdili prisotnost gena *bla*<sub>VIM-1</sub>, smo sev želeli uvrstiti v sekvenčno skupino, za kar se pogosto uporablja metoda MLST. Pri vzorcu MB3 smo pomnožili 7 gospodinjskih genov (preglednica 5) (za sestavo reakcijske mešanice in razmere pomnoževanja glej poglavje 3.2.2.2, za potek elektroforeze pa poglavje 3.2.2.3). Očiščene fragmente smo poslali v MacroGen inc. (Seoul, Koreja), kjer so določili njihovo nukleotidno zaporedje. Le-te smo nato s pomočjo spletnih programskih orodij (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) analizirali.

### 3.2.2.7 *Ugotavljanje prisotnosti integrona in uvrstitev v razred*

Pri vzorcu MB3 smo želeli preveriti prisotnost integrona. Z reakcijo PCR smo pomnožili ohranjena segmenta 5'CS in 3'CS (za sestavo reakcijske mešanice in razmere pomnoževanja glej poglavje 3.2.2.2, za potek elektroforeze poglavje 3.2.2.3). Pomnožke PCR (približne velikosti 3,5 kb) smo izrezali iz gela, očistili in jih poslali v MacroGen inc. (Seoul, Koreja). Tam so nam določili nukleotidno zaporedje, ki smo ga nato s pomočjo programa BLASTn primerjali z znanimi nukleotidnimi zaporedji.

### 3.2.2.8 *Konjugativni prenos plazmida z zapisom za NDM-1 v laboratorijski sev E. coli J53 Az<sup>r</sup>*

V 30 ml tekočega gojišča BHI smo resuspendirali polno zanko posameznega donorskega seva (20150 a, b, c; 9526 a, b, c; ABA<sub>KA</sub>, ABA<sub>CTX</sub> in NCTC 13443) ter recipientskega seva J53 Az<sup>r</sup> (sev smo namnožili v več paralelkah, ki smo jih označili J53<sub>3</sub>, J53<sub>4</sub> in J53<sub>org</sub>). Gojišča z bakterijami smo inkubirali pri 37 °C na stresalniku do srednje logaritemske faze rasti (spektrofotometrično merjenje optične gostote pri valovni dolžini 590 nm - absorbanca 0,375). V prazne, sterilne 150-ml erlenmajerice smo odpipetirali 0,5–1 ml posamezne donorske kulture in 2–3 ml posameznega recipienta (J53<sub>3</sub>, J53<sub>4</sub> in J53<sub>org</sub>). Tako nastavljene konjugacije smo inkubirali 6 ur pri 37 °C, brez stresa.

100 µl neredčene in ustrezno redčene posamezne konjugacijske mešanice smo razmazali na selektivno gojišče LB ali KA, ki smo mu za selekcijo proti donorju dodali natrijev azid (laboratorijski sev *E. coli* J53 je odporen proti natrijevemu azidu) in za selekcijo proti recipientu antibiotik ceftazidim (donorji so bili odporni). Plošče smo preko noči inkubirali pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije transkonjugant na števnih ploščah. Iz števila zraslih transkonjugant in povprečja števila recipienta smo izračunali frekvenco konjugacije. Za kontrolo smo na enaka selekcijska gojišča posamezno razmazali po 50 µl donorja in recipienta.

Število recipienta smo ugotovili tako, da smo na trdno gojišče LB ali KA nacepili po 100 µl posameznih redčitev ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in  $10^{-8}$ ; redčenje v fiziološki raztopini) recipientov J53<sub>3</sub>, J53<sub>4</sub> in J53<sub>org.</sub>. Plošče smo inkubirali pri 37 °C preko noči. Prešteli smo zrasle kolonije in iz dobljenih rezultatov izračunali povprečje recipienta, ki smo ga uporabili za izračun frekvence transkonjugant.

Frekvenco konjugacije smo izračunali po enačbi:

$$\frac{\text{povprečno število transkonjugant/ml}}{\text{povprečno število recipienta/ml}}$$

Pri pregledu selektivnih gojišč po konjugaciji smo opazili rast morfološko različnih kolonij. Nekatere od teh zraslih kolonij smo precepili na selektivna gojišča in inkubirali vsaj 24 ur. Iz zraslih kultur smo pripravili bakterijske lizate v vodi (za pripravo glej odstavek 3.2.2.1.1). Da bi ugotovili ali so te domnevne transkonjugante dejanske transkonjugante ali pa so donorski sevi, ki so pridobili odpornost proti azidu, smo pri vseh z reakcijo PCR določili filogenetsko skupino. Zapis za filogenetsko skupino je zapisan v kromosomski DNA in se s konjugacijo ne prenese. Kot kontrolo smo uporabili recipient J53 Az<sup>f</sup>. V primeru, da je bila filogenetska skupina domnevnih transkonjugant in recipienta J53 Az<sup>f</sup> enaka smo lahko potrdili, da gre za dejanske transkonjugante. Uspešnost konjugativnega prenosa smo dodatno preverili tudi s pomnoževanjem nukleotidnega zaporedja gena *bla*<sub>NDM-1</sub> (za reakcijsko mešanico, razmere pomnoževanja in elektroforezo glej poglavja 3.2.2.2 in 3.2.2.3). Pozitiven rezultat za prisotnost gena *bla*<sub>NDM-1</sub> pri testiranih



transkonjugantah pomeni, da se je gen s konjugacijo prenesel. Kot kontrolo smo uporabili bakterijska seva 9526 in NCTC 13443, ki imata zapis za *bla*<sub>NDM-1</sub>.

### 3.2.2.9 Analiza plazmidov izoliranih iz donorskih sevov in transkonjugant

#### 3.2.2.9.1 Izolacija plazmidne DNA

Donorske seve 20150, 9526 in ABA, ki imajo zapis za gen *bla*<sub>NDM-1</sub> ter kontrolni sev NCTC 13443 smo precepili na sveža trdna gojišča KA in LB, ki smo mu dodali cefotaksim in jih čez noč inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo polno zanko posamezne bakterijske kulture prenesli v pripravljena tekoča gojišča LB z ampicilinom. Bakterijske celice smo namnožili preko noči na stresalniku (180 obratov/min) pri 37 °C.

Izbrane transkonjugante (preglednica 9) smo precepili na selektivna trdna gojišča (NaAz in Ctz) in jih preko noči inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo v prazne, sterilne 500-ml erlenmajerice odpipetirali 100 ml tekočega gojišča LB in mu sterilno dodali 20 µl Ctz. V gojišče smo nacepili polno zanko kolonij zraslih na gojišču in preko noči inkubirali na stresalniku (180 vrtljajev/min) pri 37 °C.

Zraslo bakterijsko kulturo donorjev in transkonjugant smo prenesli v centrifugirke. Plazmidno DNA smo izolirali s kompletom za izolacijo plazmidne DNA, "QIAGEN® Plasmid Midi Kit (low-copy plasmids, 100)" (QIAGEN), po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo. V jamice 0,9 % gela smo nanесли 15 µl vzorca. Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV-svetlobo in ugotavljali prisotnost plazmidov.

**Preglednica 9.** Transkonjugante, iz katerih smo izolirali plazmidno DNA.

Oznaka transkonjugante	Donor	Recipient
100	ABA	J53 <sub>4</sub>
101	NCTC 13443	J53 <sub>3</sub>
102	20150 a	J53 <sub>3</sub>
103	9526 b	J53 <sub>4</sub>

#### 3.2.2.9.2 Restrikcija izolirane plazmidne DNA

Pripravili smo si 20 µl restriksijske mešanice. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 13 µl izolirane plazmidne DNA, 1,5 µl ustreznega encima (*Pst*I ali *Hind*III ali *Xba*I ali *Xho*I), 2 µl pufru za delovanje encima (Fermentas) in dopolnili z deionizirano vodo do končnega volumna 20 µl. Tako pripravljene mešanice smo pretresli in 30 minut inkubirali v vodni kopeli, segreti na 37 °C. Restriksijske mešanice smo z nanašalnim pufrom nanесли na 1 % agarozni gel. Kot standardno DNA-lestvico smo uporabili lestvico "1 kb DNA Ladder". Fragmente DNA smo ločevali 8 ur pri električni napetosti 8 V/cm gela.

## 4 REZULTATI

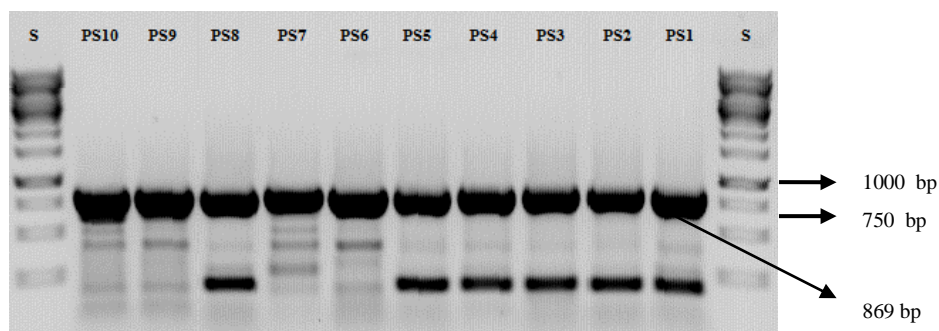
### 4.1 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH ZAPISOV ODPORNOSTI PROTI KARBAPENEMOM

Z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi smo preverili prisotnost izbranih genov, ki posredujejo odpornost proti karbapenemom. V analizo smo vključili seve, ki so navedeni v preglednici v prilogi A.

Prisotnost karbapenemaznih genov smo ugotavljali v zbirki 31 izolatov *P. aeruginosa*, 4 izolatov *E. coli* in 32 izolatov *K. pneumoniae*. Pri 29 (93,5 %) izolatih *P. aeruginosa* smo ugotovili prisotnost gena *bla*<sub>OXA-50</sub>. Pri izolatu MB3 (*P. aeruginosa*) smo ugotovili zapis za gen *bla*<sub>VIM-1</sub>. Zapis za gen *bla*<sub>OXA-60</sub> smo zasledili pri 2 (6,5 %) izolatih *P. aeruginosa*, ki sta bila izolirana pri bolnikih s cistično fibrozo.

Da bi se prepričali ali gre v resnici za iskani gen smo fragmente DNA ustrezne velikosti pričakovanega pomnožka izrezali iz gela in očistili ter poslali v Macrogen inc. (Seoul, Koreja), kjer so določili nukleotidno zaporedje pomnožka. Dobljeno nukleotidno zaporedje pomnožkov PCR smo nato s pomočjo spletnega programa BLASTn primerjali z nukleotidnimi zaporedji v bazi podatkov in ga tako potrdili.

Pri analizi nukleotidnih zaporedij za gen *bla*<sub>OXA-50</sub> smo največjo homologijo (99 %) dobili s kromosomsko zapisano oksacilinazo *bla*<sub>OXA-50</sub> pri vrsti *P. aeruginosa*. Nukleotidno zaporedje za gen *bla*<sub>OXA-60</sub> je imelo največjo homologijo (91 %) s kromosomsko zapisano oksacilinazo *bla*<sub>OXA-60</sub> iz vrste *Ralstonia pickettii*. Nukleotidno zaporedje za *bla*<sub>VIM-1</sub> pri vzorcu MB3 pa je imelo največjo homologijo (99 %) z genom *bla*<sub>VIM-1</sub>. Ugotovljena nukleotidna zaporedja vzorcev, ki so bili pozitivni, so zbrana v prilogi C.



**Slika 6.** Primer agaroznega gela po elektroforezi pomnožkov PCR za gen *bla*<sub>OXA-50</sub> (869 bp). Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi dobimo pomnožek PCR, ki je ustrezne velikosti. Z oznako S je označena standardna DNA-lestvica "1 kb DNA Ladder".

#### 4.2 UVRSTITEV SEVA *P. aeruginosa* Z OZNAKO MB3 V SEKVENČNO SKUPINO (ST) NA OSNOVI MLST

S pojavom vse večjega števila odpornih sevov *P. aeruginosa* se je pojavilo vprašanje ali gre za genetsko različne vrste ali za širjenje klonalne skupine. Izolat MB3 je prvi opisani primer bakterije, ki tvori VIM-1, v Sloveniji (Ambrožič Avguštin in sod., 2010). Želeli smo mu določiti sekvenčno skupino in preveriti ali gre za (ne)pogost sekvenčni tip.

Z reakcijo PCR smo pri vzorcu MB3 namnožili 7 gospodinjskih genov. V Macrogen inc. (Seoul, Koreja) so določili nukleotidno zaporedje pomnožkov PCR, ki smo jih nato s pomočjo programskih orodij na spletu ([http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pa\\_profiles.xml](http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pa_profiles.xml)) analizirali. Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR so zbrana v prilogi D.

Na podlagi ustrezne kombinacije alelov smo izolat *P. aeruginosa* z oznako MB3 uvrstili v sekvenčno skupino ST621 (preglednica 10).

**Preglednica 10.** Kombinacije alelov sedmih gospodinjiskih genov in sekvenčna skupina (ST).

Oznaka seva vrste <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	Alelna številka gospodinjiskih genov							Sekvenčna skupina
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
MB3	15	5	20	5	1	4	25	ST621

#### 4.3 INTEGRON IZOLATA MB3 BAKTERIJE *P. aeruginosa*

Večina genov z zapisi za karbapenemaze je v integronih razreda 1. Ker je izolat MB3 prvi opisani izolat iz Slovenije, ki je pozitiven za prisotnost karbapenemaze VIM-1 (Ambrožič Avguštin in sod., 2010), smo želeli preveriti ali je determinanta odpornosti na integronu in če je, ali gre za integron razreda 1.

Glede na analizo nukleotidnih zaporedij pomnožkov PCR smo potrdili, da gre za integron in da spada v razred 1. Največjo homologijo smo ugotovili z integroni In75, In80 in In81. Ker smo pomnožili le ohranjena segmenta 5'CS in 3'CS, značilna za integrone razreda 1, nismo mogli natančno določiti, za kateri integron gre.

#### 4.4 ANALIZA TRANSKONJUGANT

Kot donorske seve smo uporabili seve z genom *bla*<sub>NDM-1</sub> (20150, 9526, ABA), ki smo jih dobili iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani ter kontrolni sev NCTC 13443, last Skupine za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. S konjugacijo smo prenesli gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, ki je na konjugativnem plazmidu donorskih sevov, v izbrani recipientski sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>.

##### 4.4.1 Uspešnost konjugativnega prenosa

Na selektivnih gojiščih LB Az Ctz smo zasledili transkonjugante pri vseh prenosi. Ker so na selektivnih gojiščih LB Az Ctz zrastle morfološko različne kolonije, smo najprej s pomočjo PCR za ugotavljanje filogenetskih skupin preverili ali so kolonije dejanske transkonjugatne ali pa donorji, ki so pridobili odpornost proti azidu. Za nadaljnje analize smo upoštevali samo dejanske transkonjugante. Od teh smo jih 15 izbrali za preverjanje prisotnosti gena *bla*<sub>NDM-1</sub> s PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za gen *bla*<sub>NDM-1</sub>. Iz njih smo pripravili lizate in izvedli PCR. Pri vseh preučevanih transkonjugantah smo potrdili prisotnost gena *bla*<sub>NDM-1</sub>.

V preglednici 11 so navedene kolonije, pri katerih smo s pomočjo PCR preverjali filogenetsko skupino in prisotnost gena *bla*<sub>NDM-1</sub>. Kot kontrolo smo uporabili seve J53 Az<sup>r</sup>, 9526 in NCTC 13443.

**Preglednica 11.** Transkonjugante, ki smo jih izolirali iz selektivnih gojišč in pri katerih smo z metodo PCR preverili uspešnost konjugativnega prenosa plazmida, na katerem je zapis za gen *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Donor × recipient	Delovna oznaka	Prisotnost gena <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Filogenetska skupina
20150 a × J53 <sub>3</sub>	1	+	ni transkonjuganta
20150 a × J53 <sub>3</sub>	2	+	A <sub>1</sub>
20150 c × J53 <sub>4</sub>	3	+	A <sub>1</sub>
20150 c × J53 <sub>4</sub>	4	+	A <sub>1</sub>
20150 c × J53 <sub>4</sub>	5	+	ni transkonjuganta
20150 b × J53 <sub>4</sub>	6	+	A <sub>1</sub>
20150 a × J53 <sub>4</sub>	7	+	ni transkonjuganta
20150 c × J53 <sub>3</sub>	8	+	A <sub>1</sub>
20150 b × J53 <sub>3</sub>	9	+	ni transkonjuganta
NCTC × J53 <sub>3</sub>	10	+	A <sub>1</sub>
NCTC × J53 <sub>4</sub>	11	+	A <sub>1</sub>
ABA × J53 <sub>3</sub>	12	+	ni transkonjuganta
ABA × J53 <sub>4</sub>	13	+	A <sub>1</sub>
ABA × J53 <sub>4</sub>	14	+	A <sub>1</sub>
9526 c × J53 <sub>4</sub>	16	+	A <sub>1</sub>
9526 c × J53 <sub>3</sub>	17	+	A <sub>1</sub>
9526 b × J53 <sub>4</sub>	18	+	A <sub>1</sub>
9526 b × J53 <sub>3</sub>	19	+	A <sub>1</sub>
9526 a × J53 <sub>4</sub>	20	+	A <sub>1</sub>
9526 a × J53 <sub>3</sub>	21	+	A <sub>1</sub>
<b>Sev <i>E. coli</i> J53 Az<sup>r</sup></b>			
J53 <sub>org</sub>	22	-	A <sub>1</sub>
J53 <sub>3</sub>	23	-	A <sub>1</sub>
J53 <sub>4</sub>	24	-	A <sub>1</sub>
<b>Kontrolna seva</b>			
9526	9526 + kontrola	+	ni transkonjuganta
NCTC	ndm+ kontrola	+	ni transkonjuganta

#### 4.4.2 Frekvenca konjugacije

Učinkovitost konjugativnega prenosa smo ovrednotili s frekvenco konjugacije, ki je podana kot število transkonjugant na recipientsko celico. Izračunana povprečna števila transkonjugant in recipienta ter izračunane frekvence konjugacije so prikazane v preglednici v prilogi F.

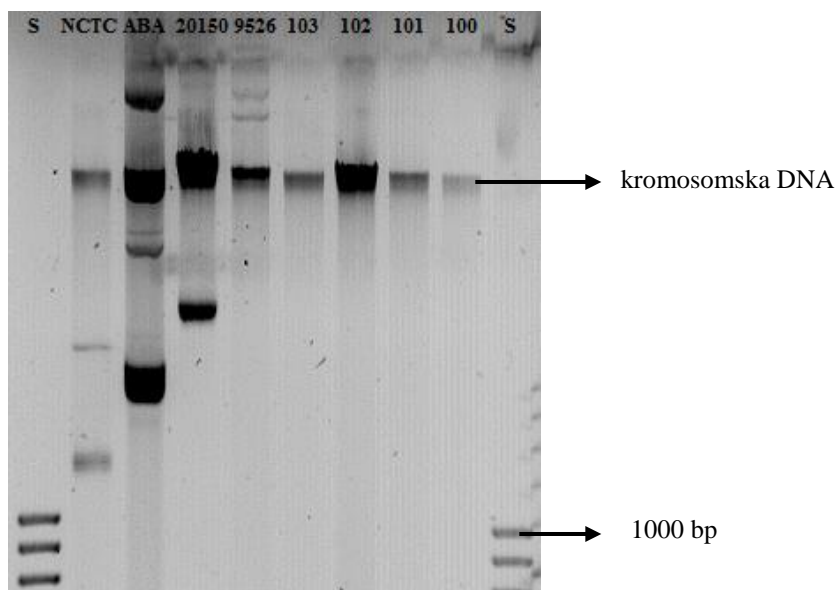
Pri konjugaciji donorskih sevov z recipientskim sevom *E. coli* J53 Az<sup>r</sup> smo dobili sledeče frekvence konjugacije (od največje proti najmanjši vrednosti):  $4,5 \times 10^{-3}$  pri sevu NCTC 13443 (*K. pneumoniae*),  $3,2 \times 10^{-4}$  pri sevu 9526 (*K. pneumoniae*),  $3,1 \times 10^{-8}$  pri sevu 20150 (*K. pneumoniae*) in  $5,7 \times 10^{-9}$  pri sevu ABA (*A. baumannii*).

#### 4.5 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

Pri vseh donorskih sevih in 4 transkonjugantah (glej preglednico 9) smo s kompletom za izolacijo plazmidne DNA, "QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Midi Kit (low-copy plasmids, 100)" (QIAGEN) po navodilih proizvajalca izolirali plazmidno DNA. Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo.

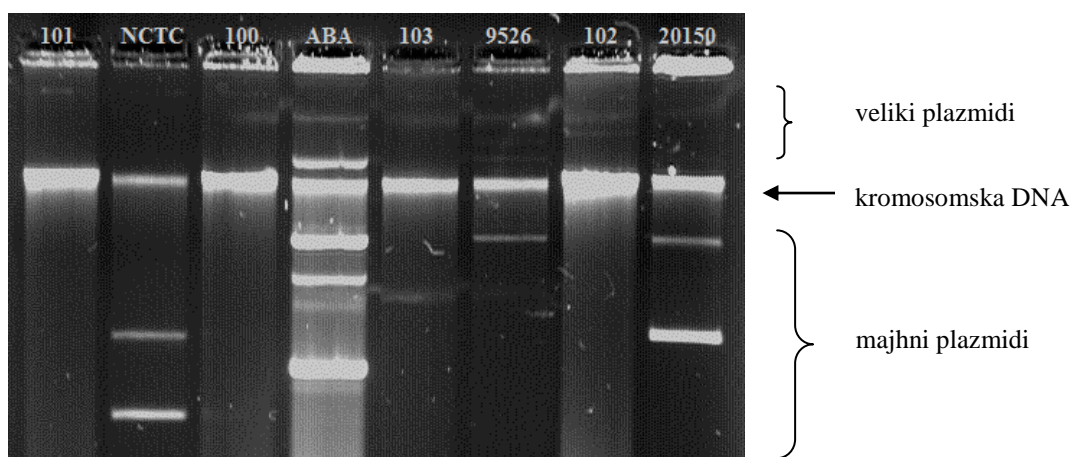
Na sliki 7 in 8 je prikazan agarozni gel po ločevanju plazmidne DNA. Tekom elektroforeze smo gel večkrat preverili pod UV-svetlobo in slikali. Ugotovili smo, da je pri vseh 4 donorskih sevih prisotnih več različno velikih plazmidov, največ pri sevu ABA. Teh plazmidov pri transkonjugantah nismo zasledili. Pri vseh vzorcih pa smo opazili prisotnost zelo velikih plazmidov, ki pa so bili zelo slabo vidni (slika 8, puščice prikazujejo te fragmente). Ko smo čez čas gel ponovno slikali, smo ugotovili, da so fragmenti sčasoma slabše vidljivi (slika 8). Kljub pazljivemu delu pri izolaciji je bila pri vseh vzorcih prisotna večja koncentracija kromosomske DNA.





**Slika 7.** Preverjanje prisotnosti plazmidov po izolaciji plazmidne DNA pri donorskih sevih in transkonjugantah.

Donorski sevi so bili sevi NCTC 13443 (oznaka NCTC), ABA, 20150 in 9526. Transkonjugante so bile 9526 × J53 (oznaka 103), 20150 × J53 (oznaka 102), NCTC 13443 × J53 (oznaka 101) in ABA × J53 (oznaka 100). Z oznako S je označena standardna DNA-lestevica "50 bp DNA Ladder".



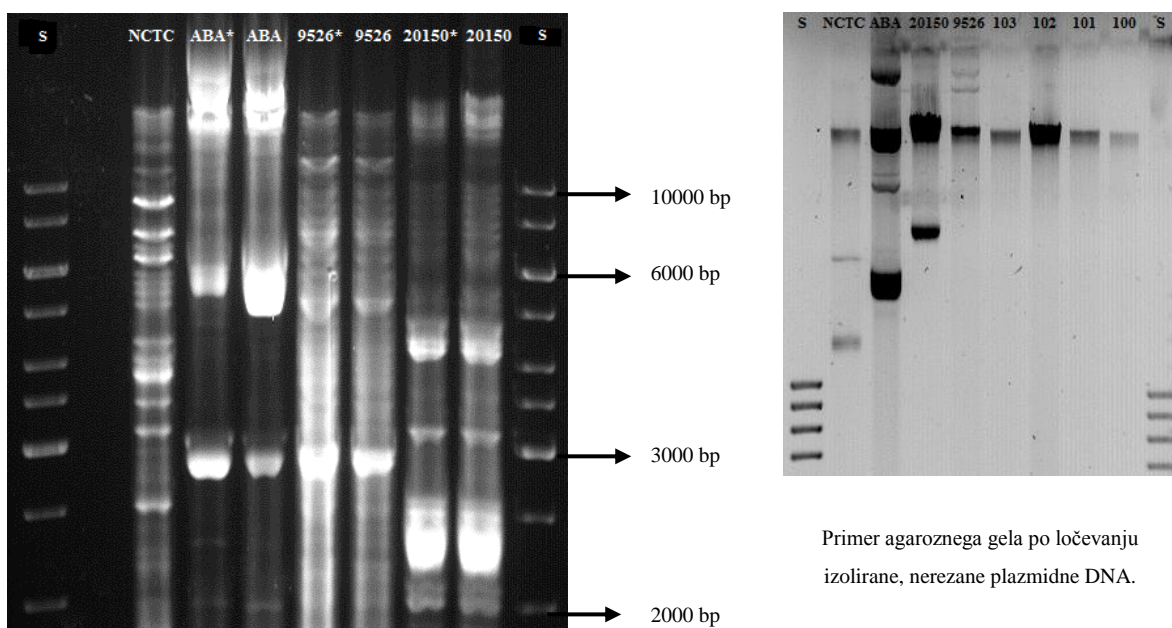
**Slika 8.** Prisotnost plazmidov pri donorskih sevih in transkonjugantah.

Prisotnost plazmidov smo ugotavljali pri vzorcih izolirane in nerezane plazmidne DNA. Donorski sevi so bili sevi NCTC 13443 (oznaka NCTC), ABA, 20150 in 9526. Transkonjugante so bile 9526 × J53 (oznaka 103), 20150 × J53 (oznaka 102), NCTC 13443 × J53 (oznaka 101) in ABA × J53 (oznaka 100).

#### 4.6 ANALIZA PLAZMIDOV IZOLIRANIH IZ NDM-1 POZITIVNIH DONORSKIH SEVOV IN TRANSKONJUGANT

Potem, ko smo potrdili prisotnosti plazmidov, smo z restrikcijo želeli preveriti ali so restrikcijski profili plazmidov enaki ali ne. Plazmidno DNA smo rezali z encimom *Pst*I, *Xho*I, *Xba*I ali *Hind*III.

Pri analizi fragmentov restrikcijskega profila plazmidov, izoliranih iz donorskih sevov, smo opazili, da so manjši plazmidi pri donorskih sevih ostali nerezani. So pa encimi rezali kromosomsko DNA (slika 9). Zaradi zelo majhne koncentracije velikih plazmidov pa restrikcijskega profila le-teh nismo mogli analizirati.



Primer agaroznega gela po ločevanju izolirane, nerezane plazmidne DNA.

**Slika 9.** Primerjava rezane plazmidne DNA (izolirane iz donorskih sevov 20150, 9526 in ABA sevov ter kontrolnega seva NCTC 13443) z nerezano plazmidno DNA. Plazmidno DNA smo rezali z restrikcijskim encimom *Pst*I. Z oznako S je označena standardna DNA-lestevica "1 kb DNA Ladder" (leva slika) in standardna DNA-lestevica "50 bp DNA Ladder" (desna slika). Simbol \* ob vzorcu pomeni, da je bakterijska kultura, iz katere smo izolirali plazmidno DNA, zrasla na krvnem agarju. Vzorci brez \* so zrasli na trdnem gojišču LB, ki smo mu kot protimikrobno učinkovino dodali cefotaksim.

Restrikcijo smo naredili še z restrikcijskimi encimi *Xho*I, *Xba*I in *Hind*III. Ugotovili smo, da restrikcija plazmidne DNA ni uspela. Manjši plazmidi so (ponovno) ostali nerazrezani.

## 5 RAZPRAVA

Bakterije, ki izločajo različne tipe karbapenemaz, so že razširjene v različnih delih sveta, a v Sloveniji je do sedaj le malo objav o bakterijah z zapisi za karbapenemaze. V naši raziskavi smo v zbirki 67 kliničnih izolatov, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom, z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) preverjali prisotnost genov karbapenemaz iz razreda A, B in D. Skušali smo ugotoviti ali je odpornost posledica prisotnosti zapisa za karbapenemaze ali pa je posledica drugih mehanizmov (odsotnost ali mutacija porinov, tvorba drugih  $\beta$ -laktamaz (npr. AmpC ali ESBL), povečana aktivnost izlivne črpalke). V naši raziskavi smo zasledili seve z geni *bla*<sub>OXA-50</sub>, *bla*<sub>OXA-60</sub> in *bla*<sub>VIM-1</sub>.

Pri 93,5 % izolatov (29/31) vrste *P. aeruginosa* smo zasledili gen *bla*<sub>OXA-50</sub>. Girlich in sodelavci (2004<sup>a</sup>) so ugotovili, da je karbapenemaza OXA-50 pri tej bakterijski vrsti naravno prisotna, zato velik odstotek OXA-50-pozitivnih izolatov ni presenetljiv. Glede na dokazano prisotnost gena *bla*<sub>OXA-50</sub> pri teh sevih bi lahko sklepali, da je fenotipska odpornost proti karbapenemom posledica tvorbe karbapenemaze OXA-50. Vendar so Girlich in sodelavci (2004<sup>a</sup>) dokazali nasprotno, tj. da encim OXA-50 sam ne posreduje odpornosti proti karbapenemom. Dokazali so, da ima vrsta *P. aeruginosa* dve kromosomsko zapisani in naravno prisotni  $\beta$ -laktamazi: inducibilno cefalosporinazo AmpC (encim se tvori dokler je prisoten substrat – sprožilec) in oksacilinazo OXA-50, ki se izraža konstitutivno (zaradi mutacije v represorskem genu *ampC* se gen začne stalno izražati, indukcija s substratom ni več potrebna). Encim OXA-50 ima ozek spekter delovanja, saj hidrolizira nekatere peniciline, cefalosporine 1. generacije, nitrocefim in imipenem (Girlich in sod., 2004<sup>a</sup>).

Podobno sta ugotovila tudi Walther-Rasmussen in Høiby (2006), saj sta opazila, da večina karbapenemaz tipa OXA kaže šibko hidrolizo karbapenemov in prišla do zaključka, da je odpornost proti karbapenemom lahko posledica kombiniranega delovanja karbapenemaze tipa OXA in sekundarnega mehanizma, kot je npr. odsotnost porina ali povečana dejavnost izlivne črpalke.

Glede na ugotovitve Girlich-a in sodelavcev (2004<sup>a</sup>) ter Walther-Rasmussen-a in Høiby-ja (2006) bi lahko sklepali, da je fenotipska odpornost proti karbapenemom tudi pri naših sevih *P. aeruginosa* posledica delovanja večih  $\beta$ -laktamaz in/ali drugih mehanizmov. Pri 3 izolatih *P. aeruginosa* smo, zraven karbapenemaze OXA-50, zasledili prisotnost še druge  $\beta$ -laktamaze – pri 2 izolatih karbapenemazo OXA-60 in pri izolatu MB3 MBL VIM-1. S tem smo potrdili, da imajo mnogi sevi zapise za več  $\beta$ -laktamaz. Ker podatkov o odpornosti sevov proti različnim protimikrobnim učinkovinam pri bolnikih, iz katerih so seve izolirali, žal nimamo, tako ne moremo sklepati, katere vrste  $\beta$ -laktamaz bi pri sevih še lahko bile prisotne. Ta domneva bi lahko bila izhodišče za nadaljnje raziskave mehanizmov odpornosti proti karbapenemom pri teh sevih.

Pri dveh izolatih (6,5 %) *P. aeruginosa*, pri katerih smo našli zapis za karbapenemazo OXA-50, smo našli tudi zapis za *bla*<sub>OXA-60</sub>. Oba izolata sta bila izolirana pri bolnikih s cistično fibrozo. Nukleotidno zaporedje obeh vzorcev je imelo 91 % homologijo z genom *bla*<sub>OXA-60</sub> iz vrste *Ralstonia pickettii* (*R. pickettii*). Karbapenemazo OXA-60 so opisali Girlich in sodelavci (2004<sup>b</sup>) in dokazali, da je pri tej vrsti naravno prisotna. OXA-60 je kromosomsko zapisana in inducibilna in ima glede na aminokislinsko zaporedje največjo podobnost s karbapenemazo OXA-50. To se kaže tudi v podobnem profilu hidrolize substratov, saj je analiza z očiščenim encimom OXA-60 pokazala, da hidrolizira amoksisicilin, benzilpenicilin, nitrocefim, tikarcilin in imipenem. Kljub temu, da so pri vrsti odkrili tudi oksacilinazo OXA-22, so ugotovili, da le karbapenemaza OXA-60 posreduje zmanjšano občutljivost za imipenem.

Walther-Rasmussen in Høiby (2006) sta ugotovila, da nekatere karbapenemaze na mobilnih genetskih elementih izvirajo iz naravno prisotnih karbapenemaz (na nemobilnih genetskih elementih). Glede na njune ugotovitve in glede na visoko homolognost (91 %) nukleotidnega zaporedja za *bla*<sub>OXA-60</sub> izolatov *P. aeruginosa* z genom *bla*<sub>OXA-60</sub> pri vrsti *R. pickettii*, bi lahko sklepali, da zasledeni gen *bla*<sub>OXA-60</sub> po vsej verjetnosti izhaja iz vrste *R. pickettii*. To domnevo lahko podkrepimo tudi s podatkom, da smo zapis za karbapenemazo OXA-60 našli pri izolatih, ki so bili izolirani iz bolnikov s cistično fibrozo (CF). CF je najpomembnejši znan dejavnik tveganja za okužbo z bakterijo *R. pickettii*, ki sicer redko povzroča okužbe, a se možnost okužbe močno poveča pri ljudeh s CF

(Stelzmueller in sod., 2006). Ljudje s CF pa so pogosto dovzetni tudi za okužbe z bakterijo *P. aeruginosa* (Madigan in Martinko, 2006), kar bi lahko nakazovalo na možnost horizontalnega prenosa determinante odpornosti med bakterijami tudi *in vivo*.

Večina karbapenemaz tipa OXA posreduje le zmanjšano občutljivost za karbapeneme. A če ni prisotnih sekundarnih mehanizmov odpornosti, kot so spremenjena prepustnost membrane, zmanjšana afiniteta PBP za karbapeneme ali povečano delovanje izlivne črpalke, je bakterije, ki tvorijo te encime, težko odkriti. Zaskrbljujoče je predvsem dejstvo, da bi prevelika klinična uporaba karbapenemov pri okužbah z vrsto *P. aeruginosa* in *A. baumannii* lahko vodila v pojav mutiranih encimov s povečano aktivnostjo proti karbapenemom (Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).

V nasprotju s karbapenemazami tipa OXA pa metalo- $\beta$ -laktamaze, še posebej IMP, VIM in NDM-1, učinkovito hidrolizirajo karbapeneme in proti njim posredujejo odpornost (Walsh in sod., 2005). Pri vzorcu MB3 (*P. aeruginosa*) smo dokazali zapis za MBL VIM-1. Nukleotidno zaporedje je imelo največjo homologijo (99 %) z genom *bla*<sub>VIM-1</sub>. Metaloencim VIM-1 so prvič zasledili prav v Evropi, pri vrsti *P. aeruginosa*, pri kateri se encimi tipa VIM najpogosteje pojavljajo. Danes so encimi tipa VIM ena izmed najbolj razširjenih in problematičnih družin MBL, saj o njih poročajo iz vseh naseljenih kontinentov (Walsh in sod., 2005). Žal podatkov o tem ali je bolnik predhodno potoval v tujino in tam prebolel kakšno okužbo nimamo. Tako tudi ne vemo ali je okužbo s sevom, ki tvori encim VIM, pridobil kje v tujini ali v Sloveniji.

Delež večkratno odpornih sevov se iz leta v leto veča. Ob tem se poraja vprašanje ali je širjenje determinant odpornosti posledica klonalnega širjenja posameznih sevov ali horizontalnega razširjanja mobilnih genetskih elementov (Curran in sod., 2004). Za odkrivanje klonalnega širjenja se običajno uporablja metoda MLST, s katero sevom določimo sekvenčni tip. Na podlagi le-tega lahko nato sklepamo na razširjenost seva. Kolikor nam je znano je vzorec MB3 prvi opisani primer bakterije, ki tvori encime VIM, v Sloveniji (Ambrožič Avguštin in sod., 2010) in zato smo želeli ugotoviti kateremu sekvenčnemu tipu (ST) naš sev pripada. Z reakcijo PCR smo pomnožili 7 gospodinjskih genov, ki imajo pomembno vlogo pri delovanju celice in so pri vrsti evolucijsko ohranjeni.

Analiza določenih nukleotidnih zaporedij teh 7 genov je razkrila, da naš izolat pripada sekvenčnemu tipu ST621.

O ST621 so v zadnjih letih poročali iz Italije, Argentine, Avstrije, Romunije in Belgije. Vsi sevi, za katere so ugotovili, da pripadajo ST621, so tvorili encim IMP-13, ki je bil v integronu in v večini primerov kromosomsko zapisan. Gena *bla*<sub>VIM-1</sub> niso zasledili pri nobenem testiranem sevu. Glede na rezultate analiz so prišli do sklepa, da je klonska linija ST621 zelo uspešna epidemična klonska linija vrste *P. aeruginosa* (Santella in sod., 2010; Naas in sod., 2011). Ti podatki bi lahko nakazovali smer od koder je VIM-pozitiven izolat *P. aeruginosa* prišel v Slovenijo, a za potrditev ali zavrnitev te domneve bi morali poznati bolnikovo anamnezo in narediti dodatne raziskave.

V veliki meri je naraščanje deleža večkratno odpornih bakterij posledica horizontalnega širjenja genov za odpornost v bakterijski združbi. Pri odkrivanju primerov horizontalnega širjenja imajo pomembno vlogo integroni, ki so vključeni v mobilne genetske elemente. Ker je MB3 prvi izolat z zapisom za karbapenemazo VIM v Sloveniji, smo želeli preveriti ali je integron prisoten tudi pri našem izolatu. Z reakcijo PCR smo pomnožili 5'-CS in 3'-CS ohranjena segmenta integrona. Lauretti in sodelavci (1999) so ugotovili, da je gen *bla*<sub>VIM-1</sub> kot genska kaseto vključen v integron razreda 1 na kromosomu seva *P. aeruginosa*. Integron je vključeval gen za integrazo, ki je tipičen pri integronih razreda 1 in gensko kaseto *aacA4*, ki posreduje odpornost proti aminoglikozidom. Glede na analizo določenih nukleotidnih zaporedij s spletnim programom BLASTn smo integron pri vzorcu MB3 uvrstili v razred 1 in tako potrdili naša pričakovanja, da integron, ki ima zapis za *bla*<sub>VIM-1</sub>, spada v razred 1.

Ker smo pomnožili le ohranjena segmenta, integrona našega seva nismo mogli natančno določiti. S primerjavo nukleotidnega zaporedja z znanimi zaporedji in glede na velikost našega integrona smo dobili več možnih integronov (In75, In80 in In81). Raznovrstnost struktur integronov razreda 1 je zelo velika, saj je s pridobitvijo in širjenjem genov *bla*<sub>VIM</sub> med po Gramu negativnimi bakterijami povezanih okrog 110 različnih struktur. V večini primerov je zraven genov *bla*<sub>VIM</sub> prisoten vsaj en ali več genov, ki posredujejo odpornost proti aminoglikozidom (*aac*) ter drugi β-laktamazni geni, kot so *bla*<sub>OXA</sub> in *bla*<sub>PSE</sub> (Zhao in

Hu, 2011). Zaradi te velike raznovrstnosti integronov razreda 1 bi za določitev, za kateri integron gre, morali poznati njegovo celotno nukleotidno zaporedje in zato bi morali pomnožiti še ostale odseke našega integrona. Vendar to ni bil naš namen, zato teh dodatnih analiz nismo naredili.

Ugotovili smo, da razširjenost bakterij, ki tvorijo karbapenemaze, zapisane na mobilnih genetskih elementih, v Sloveniji (še) ni velika, vendar pojav pridobljenih MBL med sevi patogenih vrst po Gramu negativnih bakterij predstavlja grožnjo iz dveh razlogov. Prvič, MBL posredujejo odpornost proti skoraj vsem znanim skupinam  $\beta$ -laktamov in so pogosto povezane z odpornostjo proti aminoglikozidom. In drugič, genski zapisi za MBL so običajno na mobilnih genetskih elementih (integroni, transpozoni, plazmidi) in se lahko s horizontalnim prenosom širijo v bakterijski združbi (Walsh in sod., 2005). V zadnjem času veliko pozornosti in skrbi vzbujajo širjenje in hitro naraščanje deleža večkratno odpornih bakterij z zapisom za NDM-1 (Kumarasamy in sod., 2010; Nordmann in sod., 2011<sup>b</sup>), ki hidrolizira skoraj vse znane  $\beta$ -laktame. O pojavu tega novega encima so prvič poročali leta 2008 (Yong in sod., 2009) in od takrat naprej vedno pogosteje poročajo o bakterijah z NDM-1 iz različnih držav sveta (Kumarasamy in sod., 2010; Walsh in sod., 2011).

K hitremu širjenju NDM-1-pozitivnih sevov pripomore dejstvo, da je gen *bla*<sub>NDM-1</sub> v večini primerov zapisan na konjugativnem plazmidu in se med bakterijami tako zlahka prenaša. Da bi preverili ali je gen *bla*<sub>NDM-1</sub> tudi pri naših donorskih sevih 20150, 9526, NCTC 13443 (vsi 3 identificirani kot vrsta *K. pneumoniae*) in ABA (vrsta *A. baumannii*) na konjugativnem plazmidu, smo s konjugacijo skušali plazmid prenesti v recipientski sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup> je zaradi odpornosti proti natrijevemu azidu idealen recipient za poskuse konjugacije, saj je namreč večina po Gramu negativnih bakterij občutljivih za natrijev azid in zato ga uporabljamo za selekcijo transkonjugant. Transkonjugante smo selekcionirali na gojišču, ki smo mu dodali natrijev azid in ceftazidim. Konjugativni prenos gena *bla*<sub>NDM-1</sub> je uspel pri vseh 4 donorskih sevih. Pri pregledu plošč smo opazili, da so na nekaterih gojiščih zrasle morfološko različne kolonije. Iz rezultatov, ki smo jih dobili z reakcijo PCR za ugotavljanje filogenetske skupine in prisotnosti gena *bla*<sub>NDM-1</sub>, smo sklepali, da so na gojiščih zraven transkonjugant zrasli tudi donorski sevi, ki so pridobili odpornost proti antibiotiku, za katerega so občutljivi (natrijev

azid) in tako preživel na selektivnem gojišču. Predvidevali smo, da so odpornost lahko pridobili z mutacijami porinov ali izlivne črpalke.

Učinkovitost konjugativnega prenosa smo ovrednotili s frekvenco konjugacije. Pri sevih *K. pneumoniae* 20150, 9526 in NCTC 13443 je bila frekvenca konjugacije večja ( $3,1 \times 10^{-8}$ ,  $3,2 \times 10^{-4}$  in  $4,5 \times 10^{-3}$ ) kot pri sevu *A. baumannii* ABA ( $5,7 \times 10^{-9}$ ), kar smo tudi pričakovali glede na to, da sta rodova *Klebsiella* in *Escherichia* genetsko sorodna. Kljub temu, da je bila frekvenca prenosa med sevoma *A. baumannii* in *E. coli* majhna, pa smo dokazali horizontalni prenos determinant odpornosti tudi med genetsko nesorodnima rodovoma. Razlike v frekvenci konjugacije nam lahko pomagajo razumeti, zakaj se med nekaterimi bakterijskimi vrstami geni odpornosti širijo hitreje kot med drugimi (Walsh in sod., 2011).

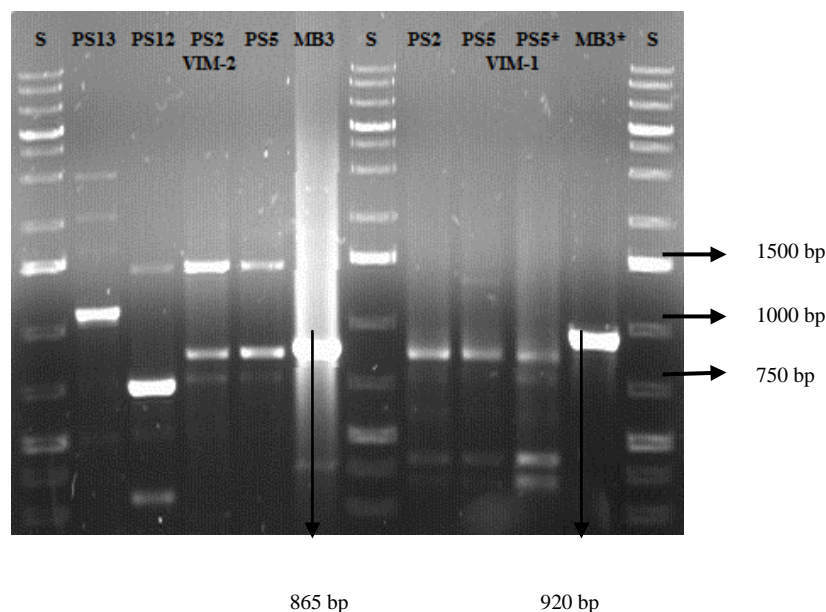
Po uspelem konjugativnem prenosu in potrditvi, da gre res za transkonjugante, smo pri naših donorskih sevih in transkonjugantah ( $9526 \times J53_4$  (103),  $20150 \times J53_3$  (102),  $NCTC\ 13443 \times J53_3$  (101) in  $ABA \times J53_4$  (100)) želeli preveriti kakšni plazmidi so prisotni. Ugotovili smo, da je pri donorskih sevih, še posebej pri sevu ABA, prisotnih več manjših plazmidov, ki jih pri transkonjugantah nismo zasledili. Glede na to smo sklepali, da ti plazmidi niso konjugativni in nimajo zapisa za  $bla_{NDM-1}$ . Pri vseh vzorcih pa smo opazili prisotnost velikih plazmidov, ki pa so kljub veliki količini nanešenega izolata bili zelo slabo vidni. Tekom elektroforeze smo agarozni gel večkrat slikali in ugotovili, da so bili ti fragmenti sčasoma vedno slabše vidljivi. Kljub naknadnemu dodatku EtBr se vidljivost fragmentov ni izboljšala. Glede na te ugotovitve smo sklepali, da so ti plazmidi najverjetneje nestabilni in se tekom analize razgrajujejo. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Walsh in sodelavci (2011) ter Poirel in sodelavci (2011). Kumarasamy in sodelavci (2010) so v raziskavi NDM-1-pozitivnih sevov ugotovili, da je gen  $bla_{NDM-1}$  zapisan v plazmidu, ki variira v velikosti od 50 do 500 kb. Ker smo velike plazmide opazili pri vseh vzorcih, smo tako sklepali, da je gen  $bla_{NDM-1}$  na teh plazmidih. Ker pa teh velikih fragmentov iz gela zaradi slabe vidljivosti nismo mogli izrezati in očistiti, tudi nismo mogli preveriti in potrditi naše domneve.



Ko smo potrdili, da so veliki plazmidi prisotni, smo želeli preveriti ali so si ti plazmidi podobni. Izolirano plazmidno DNA smo zato rezali z različnimi restrikcijskimi encimi. A ker je bila koncentracija velikih plazmidov zelo majhna in ker so se ti plazmidi tekom analize razgrajevali, restrikcijskega profila le-teh nismo mogli analizirati. Tako nismo mogli ugotoviti ali so si plazmidi podobni ali ne. Pri analizi restrikcijskih profilov smo opazili tudi, da so bili fragmenti manjših plazmidov, ki so ostali nerezani in fragmenti rezane kromosomske DNA v vseh primerih restrikcijske analize videti "razmazani", kar lahko nakazuje na delovanje endonukleaz tekom analize.

Pri tem raziskovalnem delu smo ponovno spoznali, da delo v laboratoriju in s tem raziskave, ki jih delamo, ne tečejo vedno tako, kot bi si želeli. Še posebej se je to izkazalo pri reakcijah PCR, saj smo na podlagi analize nukleotidnega zaporedja opazili, da z nekateri začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju, dobimo lažno pozitivne rezultate (slika 10). Po pomnoževanju gena *bla*<sub>VIM-2</sub> smo pri vzorcu MB3 opazili le en fragment DNA, ki je bil ustrezne velikosti. Pri analizi nukleotidnega zaporedja pa smo največjo homologijo dobili z genom *bla*<sub>VIM-1</sub>. Prav tako smo fragment pričakovane velikosti za gen *bla*<sub>VIM-2</sub> zasledili pri vzorcu PS2 in PS5. Vendar je analiza nukleotidnega zaporedja teh pomnožkov pokazala, da kljub ustrezni velikosti pomnožkov PCR pravzaprav ne gre za iskani gen *bla*<sub>VIM-2</sub> in tudi ne za gen *bla*<sub>VIM-1</sub> (kot v primeru vzorca MB3). Zato je zelo pomembno, da konstruiramo začetne oligonukleotide, ki so specifični za iskane gene in določimo razmere pomnoževanja za vsak gen posebej, saj v nasprotnem primeru dobimo nespecifične rezultate. Kjer pomnožka PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi nismo opazili, lahko z gotovostjo trdimo, da iskani gen pri sevu ni prisoten.

Kakšne rezultate z reakcijo PCR dobimo je odvisno tudi od načina priprave vzorcev. Tako smo želeli ugotoviti ali drugačen način priprave lizata vpliva na rezultat pomnoževanja. Pri vzorcih, ki so bili izolirani pri bolnikih s cistično fibrozo, smo uporabili dva načina priprave bakterijskih lizatov – bakterijski lizati v vodi in v pufru TE. V nekaterih primerih so bili rezultati lizatov v pufru TE boljši, saj smo pri teh dobili večjo količino pomnožka. V drugih primerih je bilo nasprotno – večjo količino pomnožka smo dobili pri lizatih v vodi. Tako neke značilne razlike v rezultatih nismo ugotovili.



**Slika 10.** Primer agaroznega gela po ločevanju pomnožkov PCR za gen *bla*<sub>VIM-1</sub> (920 bp) in *bla*<sub>VIM-2</sub> (865 bp). Pri vzorcu MB3\* in PS5\* smo uporabili drugačno polimerazo ("PCR Master Mix") kot pri ostalih vzorcih ("Dream Taq Green PCR Master Mix"). Z oznako S je označena standardna DNA-lestevica "1 kb Plus DNA Ladder".

Čeprav smo ugotovili, da razširjenost bakterij, ki tvorijo karbapenemaze, pri nas še ni velika, po vsej verjetnosti ta ugotovitev ne odraža realnega stanja. Klinična detekcija karbapenemaz na podlagi fenotipskega testiranja občutljivosti za protimikrobne učinkovine pri izolatih patogenih bakterij nam mnogokrat da lažne rezultate. Tako karbapenemaze ostajajo neodkrite in se še naprej uspešno razširjajo. Zato je za odkrivanje in preprečevanje njihovega širjenja potrebna posebna skrb.

Pojavljanje odpornih sevov nedvomno odraža nepremišljeno uporabo protimikrobnih učinkovin. Ker so karbapenemi eni redkih protimikrobnih učinkovin, ki (še) ostajajo učinkoviti proti večkratno odpornim po Gramu negativnim patogenom, bi morali omejiti njihovo uporabo in jih še naprej uporabljati le kot rezervne protimikrobne učinkovine.

## 6 SKLEPI

- V zbirki 31 sevov *P. aeruginosa*, 32 sevov *K. pneumoniae* in 4 sevov *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom, smo preverili ali je le-ta posledica prisotnosti testiranih karbapenemaz. Zapis za karbapenemaze smo našli le pri sevih *P. aeruginosa*.
- Zapis  $bla_{OXA-50}$  smo našli pri 93,5 % izolatov (29/31) *P. aeruginosa*.
- Pri 6,5 % izolatov (2/31) *P. aeruginosa* smo odkrili zapis  $bla_{OXA-60}$ .
- Pri 3 % izolatov (1/31) *P. aeruginosa* (izolat MB3) smo našli zapis za MBL VIM-1.
- Izolatu MB3 smo z metodo MLST določili sekvenčni tip ST621. Gre za zelo uspešen epidemičen klon vrste *P. aeruginosa*.
- Pri izolatu MB3 smo potrdili prisotnost integra in ga uvrstili v razred 1.
- Razširjenost bakterij s pridobljenimi karbapenemazi je v Sloveniji trenutno majhna.
- Pri konjugaciji donorskih sevov z genom  $bla_{NDM-1}$  z recipientskim sevom *E. coli* J53 Az<sup>r</sup> se je plazmid z determinanto odpornosti prenesel iz vseh 4 donorjev.
- Uspel nam je horizontalni prenos plazmidov med genetsko sorodnima rodovoma *Klebsiella* in *Escherichia* in genetsko nesorodnima rodovoma *Acinetobacter* in *Escherichia*.
- Pri vseh donorskih sevih in transkonjugantah smo zasledili prisotnost velikih plazmidov, ki pa so bili nestabilni in so se tekom analize razgrajevali.
- Sklepali smo, da je zapis za  $bla_{NDM-1}$  na teh velikih plazmidih. Ker je bila koncentracija teh plazmidov v vzorcu zelo majhna naše domneve nismo mogli potrditi.
- Podobnosti konjugativnih plazmidov zaradi majhne koncentracije in ker so se tekom analize dodatno razgrajevali nismo mogli določiti.

## 7 POVZETEK

Karbapenemi so pomembna, velikokrat edina terapevtska učinkovina za zdravljenje okužb z večkratno odpornimi po Gramu negativnimi bakterijami. Še posebej z bakterijami, ki izločajo ESBL ali AmpC. Med skupinami  $\beta$ -laktamskih antibiotikov imajo karbapenemi najširši spekter delovanja proti  $\beta$ -laktamazam. Vendar pa je njihova klinična uporaba ogrožena zaradi hitrega naraščanja proti karbapenemom odpornih sevov. Odpornost po Gramu negativnih bakterije je lahko posledica več različnih mehanizmov. A trenutno so najbolj zaskrbljujoče karbapenemaze na mobilnih genetskih elementih, ki se pojavljajo in širijo že na vseh poseljenih kontinentih sveta.

Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti ali se bakterije z zapisi za karbapenemaze pojavljajo tudi že v Sloveniji. Prisotnost determinant odpornosti proti karbapenemom smo z metodo PCR preverili v zbirki 31 izolatov *P. aeruginosa*, 32 izolatov *K. pneumoniae* in 4 izolatov *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom. Zapis za vsaj eno izmed determinant odpornosti proti karbapenemom smo našli pri 29 (93,5 %) izolatih *P. aeruginosa*. Pri vseh 29 izolatih smo našli gen za pri vrsti naravno prisotno karbapenemazo OXA-50. Pri dveh izolatih pa smo odkrili še gen za *bla*<sub>OXA-60</sub>. Večina karbapenemaz tipa OXA posreduje le zmanjšano občutljivost za karbapeneme, odpornost proti njim pa je posledica večih  $\beta$ -laktamaz in kombinacije mehanizmov odpornosti. Zapisa za karbapenemaze nismo našli pri nobenem od izolatov *K. pneumoniae* in *E. coli*.

Pri izolatu MB3 (*P. aeruginosa*) smo, zraven gena za *bla*<sub>OXA-50</sub>, odkrili zapis za *bla*<sub>VIM-1</sub>, ki je ena izmed najbolj razširjenih karbapenemaz, saj o njej poročajo iz vseh delov sveta. Gene za *bla*<sub>VIM</sub> v večini primerov najdemo kot genske kasete v integronih razreda 1, zato smo pri izolatu preverili prisotnost integrona in ga naknadno uvrstili v razred 1. Ker je raznovrstnost struktur integronov razreda 1 zelo velika, nismo mogli natančno določiti, za kateri integron razreda 1 gre. Z metodo MLST smo MB3 uvrstili v sekvenčni tip ST621, ki je uspešna epidemična klonska linija vrste *P. aeruginosa*.

Geni z zapisi za karbapenemaze se v bakterijski združbi najpogosteje in najhitreje širijo s horizontalnim prenosom konjugativnih plazmidov, ki te gene vključujejo. V zadnjih letih

je v središču pozornosti pojav zelo odpornih bakterij, ki imajo zapis za MBL NDM-1. Tako kot večina MBL je tudi gen *bla*<sub>NDM-1</sub> na konjugativnem plazmidu. Mobilnost determinante odpornosti NDM-1 smo dokazali v poskusu konjugacije donorskih sevov, ki imajo zapis za NDM-1 z recipientskim sevom *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Konjugativni prenos nam je uspel tako med genetsko sorodnima (*Klebsiella* in *Escherichia*) kot genetsko nesorodnima (*Acinetobacter* in *Escherichia*) rodovoma, čeprav je bila frekvenca konjugacije med slednjima, pričakovano, manjša. Uspešnost prenosa gena *bla*<sub>NDM-1</sub> smo dodatno potrdili z metodo PCR. Ker smo na gojišču zasledili rast morfološko različnih kolonij, smo nekatere od teh kolonij ponovno nacepili in pripravili lizate. Z reakcijo PCR za ugotavljanje filogenetske skupine smo preverili ali so zrasle kolonije kolonije transkonjugant ali kolonije donorskih sevov. V filogenetsko skupino A<sub>1</sub>, kamor spada tudi recipientski sev, smo uvrstili 15 (od 20) preučevanih kolonij. Ugotovili smo, da so opažene morfološko različne kolonije, ki so zrasle na selektivnih gojiščih, donorske bakterije, ki so z mutacijami pridobile odpornost in tako preživele na selektivnem gojišču.

Iz donorskih sevov in transkonjugante posameznega donorja smo izolirali plazmide, jih rezali in primerjali med seboj. Pri vseh vzorcih smo opazili prisotnost velikih plazmidov, za katere se je izkazalo, da so nestabilni in se tekom analize razgrajujejo. Restrikcija plazmidov ni bila uspešna, saj so manjši plazmidi ostali nerezani, restriksijskega profila velikih plazmidov pa zaradi zelo majhne koncentracije v vzorcu nismo mogli analizirati.

Razširjenost karbapenemaz pri po Gramu negativnih patogenih bakterijskih vrstah v Sloveniji še ni velika, vendar smo analizirali le manjše število sevov. Za realnejše stanje bi bilo potrebno analizirati večje število sevov. Zaradi širjenja zapisov za karbapenemaze morajo fenotipski testi za odkrivanje karbapenemaz biti rutinsko vključeni v določanje občutljivosti za protimikrobne učinkovine pri izolatih po Gramu negativnih bakterij, ki jih izoliramo iz kužnin.

## 8 VIRI

### CITIRANI VIRI

- Advisory Committee on Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infection (ARHAI) and Health Protection Agency (HPA). 2011. Advice on carbapenemase producers: recognition, infection control and treatment. ARHAI and HPA: 7 str.
- Afzal-Shah M., Woodford N., Livermore D. M. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26 in OXA-27 molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2: 583-588.
- Alba J., Ishii Y., Thomson K., Smith Moland E., Yamaguchi K. 2005. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 11: 4760-4762.
- Ambler R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 289: 321-331.
- Ambler, R. P., Coulson A. F., Frere J., Ghuisen J., Joris B., Forsman M., Levesque R., Tiraby G., Waley S. 1991. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochemical Journal*, 276: 269-270.
- Ambrožič Avguštin J. 2011. Razvoj rezistence (odpornosti) proti antibiotikom. *Biološka znanost in družba*, 44-48.
- Ambrožič Avguštin J., Žgur Bertok D., Lorenčič Robnik S., Golle A., Pirš M., Müller-Premru M., Križan-Hergouth V., Seme K. 2010. First detection of VIM-1 producing *P. aeruginosa* isolate in Slovenia. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 April 2010. Elsevier, 2010, S643-4.
- Aubron C., Poirel L., Ash R. J., Nordmann P. 2005. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 2: 260-264.
- Baño J. R., Navvaro M. D., Romero L., Martínez-Martínez L., Muniain M. A., Perea E. J., Pérez-Cano R., Pascual A. 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3: 1089-1094.

- Baquero F., Nombela C., Cassell G. H., Gutierrez-Fuentes J. A. 2008. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. 1<sup>st</sup> edition. Washington D. C., ASM Press.
- Bradford P. A., Bratu S., Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal J. J., Brooks S., Cebular S., Quale J. 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 55-60.
- Bush K., Jacoby G. A. 2010. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3: 969-976.
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 6: 1211-1233.
- Castanheira M., Toleman M. A., Jones R. N., Schmidt F. J., Walsh T. R. 2004. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 12: 4654-4661
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558.
- Cohen J., Powderly W. G., Opal S. M. 2010. Infectious diseases. 3<sup>rd</sup> edition. Vol. 2. St. Louis, Missouri; London. Mosby, Elsevier Limited.
- Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C. G. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 12: 5644-5649.
- Donald H. M., Scaife W., Amyes S. G. B., Young H. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1: 196-199.
- Edwards J. R., Betts M. J. 2000. Carbapenems: the pinnacle of the  $\beta$ -lactam antibiotics or room for improvement?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 1-4.
- Fankhauser C., Zingg W., Francois P., Dharan S., Schrenzel J., Pittet D., Harbarth S. 2009. Surveillance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Swiss tertiary care hospital. *Swiss medical weekly*, 139, 51-52: 747-751.

- Fluit A. C., Schmitz F.-J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 4: 272-288.
- Gaibani P., Ambretti S., Berlinger A., Cordovana M., Farruggia P., Panico M., Landini M. P., Sambri V. 2011. Outbreak of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in northern Italy, July to August 2011. *Eurosurveillance*, 16, 47.
- Garrity G. M., Brenner D. J., Krieger N. R., Staley J. T. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition. Vol. 2.: The proteobacteria (part C). New York Springer.
- Girlich D., Naas T., Nordmann P. 2004<sup>a</sup>. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 6: 2043-2048.
- Girlich D., Naas T., Nordmann P. 2004<sup>b</sup>. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 11: 4217-4225.
- Giske C. G., Gezelius L., Samuelsen Ø., Warner M., Sundsfjord A., Woodford N. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disk supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17, 4: 552-556.
- Gubina M., Ihan A. 2002. *Medicinska bakteriologija z imunologija in mikologijo*. Ljubljana, Medicinski razgledi: 543 str.
- Gupta V. 2008. Metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(2): 131-143.
- Héritier C., Dubouix A., Poirel L., Marty N., Nordmann P. 2005<sup>b</sup>. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 115-118.
- Héritier C., Poirel L., Fournier P.-E., Claverie J.-M., Raoult D., Nordmann P. 2005<sup>a</sup>. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 10: 4174-4179.
- Holden N. J., Gally D. L. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal of medical microbiology*, 54: 585-593.



- Jovcic B., Lespanovic Z., Suljagic V., Rackov G., Begovic J., Topisirovic L., Kojic M. 2011. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 8: 3929-3931.
- Kasse M., Nordmann P., Wichelhaus T. A., Gatermann S. G., Bonnin R. A., Poirel L. 2011. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 6: 1260-1263
- Kattan J. N., Villegas M. V., Quinn J. P. 2008. New developments in carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 12: 1102-1111.
- Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. 2005. *Medical Microbiology*. 2<sup>nd</sup> edition. Stuttgart, New York. Georg Thieme Verlag: 698 str.
- Kumarasamy K., Toleman M. A., Walsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U. in drugi. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9): 597-602.
- Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R., Rossolini G. M. 1999. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 7: 1584-1590.
- Lee K., Yong D., Jeong S. H., Chong Y. 2011. Multidrug resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Medical Journal*, 52, 6: 879-891.
- Lee K., Yum J. H., Yong D., Lee H. M., Kim H. D., Docquier J.-D., Rossolini G. M., Chong Y. 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 11: 4485-4491.
- Levesque C., Piche L., Larose C., Roy P. H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 185-191.
- Livermore D. M., Woodford N. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology*, 3: 489-495.

- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> edition. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Mariotte-Boyer S., Nicolas-Chanoine M. H., Labia R. 1996. A kinetic study of NMC-A  $\beta$ -lactamase, an Ambler class A carbapenemase laso hydrolyzing cephamycins. FEMS Microbiology Letters, 143, 1: 29-33.
- Mazzariol A., Bošnjak Z., Ballarini P., Budimir A., Bedenić B., Kalenić S., Cornaglia G. 2012. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. Emerging Infectious Diseases, 18, 3: 532-534.
- Medeiros A. A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. Clinical Infection Diseases, 24 (Suppl 1): S19-45.
- Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., Galani I., Giske C. G., Gniadkowski M. in drugi. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clinical microbiology and Infection, 16, 2: 112-122.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2005. Medical microbiology. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia, Elsevier Mosby: 963 str.
- Naas T., Bogaerts P., Kostyanev T., Cuzon G., Huang T.-D., Ozsu S., Nordmann P., Glupczynski Y. 2011. Silent spread of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging to sequence type 621 in Belgium. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66, 9: 2178-2179.
- Nordmann P., Cuzon G., Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. The Lancet Infectious Diseases, 9: 228-236.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. 2011<sup>a</sup>. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerging Infectious Diseases, 17, 10: 1791-1798.
- Nordmann P., Mariotte S., Naas T., Labia R., Nicolas M. 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37, 5: 939-946.
- Nordmann P., Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical Microbiology and Infection, 8, 6: 321-331.
- Nordmann P., Poirel L., Toleman M. A., Walsh T. R. 2011<sup>b</sup>. Does broadspectrum  $\beta$ -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of

- infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 689-692.
- Pasteran F., Mendez T., Guerriero L., Rapoport M., Corso A. 2009. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 6: 1631-1639.
- Paterson D. L. 2000. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6: 460-463.
- Paterson D. L., Bonomo R. A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Review*, 18, 4: 657-686.
- Paton R., Miles R. S., Hood J., Amyes S. G. B. 1993. ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2, 2: 81-87.
- Perez F., Endimiani A., Hujer K. M., Bonomo R. A. 2007. The continuing challenge of ESBL's. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 5: 459-469.
- Pirš M., Andlovic A., Cerar T., Žohar-Čretnik T., Kobola L., Kolman J., Frelj T., Prešern-Štrukelj M., Ružič-Sabljić E., Seme K. 2011. A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya. *Eurosurveillance*, 16, 50: 1-2.
- Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1: 15-22.
- Poirel L., Le Thomas I., Naas T., Karim A., Nordmann P. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3: 622-632.
- Poirel L., Rodríguez-Martínez J.-M., Al Naiemi N., Debets-Ossenkopp Y. J., Nordmann P. 2010. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 6: 2420-2424.

- Public Health Agency of Canada. 2010. Guidance: Infection Prevention and Control Measures for Healthcare Workers in All Healthcare Settings. Carbapenem-resistant Gram-negative Bacilli: 6 str.  
<http://www.phac-aspc.gc.ca>
- Queenan A. M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 3: 440-458.
- Radice M., Power P., Gutkind G., Fernández K., Vay C., Famiglietti A., Ricover N., Ayala J. 2004. First class A carbapenemase isolated from *enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3: 1068-1069.
- Rasmussen B. A., Bush K., Keeney D., Yang Y., Hare R., O'Gara C., Medeiros A. A. 1996. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 9: 2080-2086.
- Santella G., Pollini S., Docquier J.-D. Mereuta A. I., Gutkind G., Rossolini G. M., Radice M. 2010. Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging to sequence type 621. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 11: 4342-4343.
- Stelzmueller I., Biebl M., Wiesmayr S., Eller M., Hoeller E., Fille M., Weiss G., Lass-Floen C., Bonatti H. 2006. *Ralstonia pickettii* – innocent bystander or a potential threat? *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 2: 99-101.
- Todar K. 2011. *Todar's online textbook of bacteriology*. Madison, Wisconsin, University of Wisconsin.  
<http://textbookofbacteriology.net/index.html> (november, december 2011).
- Toleman M. A., Simm A. M., Murphy T. A., Gales A. C., Biedenbach D. J., Jones R. N., Walsh T. R. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 673-679.
- Vila J., Martí S., Sánchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 1210-1215.
- Walther-Rasmussen J., Høiby N. 2007. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 470-482.

- Walther-Rasmussen J., Høiby N. 2006. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 373-383.
- Walsh T. R., Bolmström A., Qwärnström A., Gales A. 2002. Evaluation of a new E test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2755-2759.
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L., Nordmann P. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 2: 306-325.
- Walsh T. R., Weeks J., Livermore D. M., Toleman M. A. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 5: 355-362.
- Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1: 147-151.
- Weldhagen G. F., Prinsloo A. 2004. Molecular detection of GES-2 extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 1: 35-38.
- Yan J. J., Hsueh P. R., Ko W. C., Luh K. T., Tsai S. H., Wu H. M., Wu J. J. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 8: 2224-2228.
- Yang Y., Wu P., Livermore D. M. 1990. Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 5: 755-758.
- Yigit H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K., Tenover F. C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4: 1151-1161.
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella*

*pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 12: 5046-5054.

Zarfel G., Hoenigl M., Leitner E., Salzer H. J., Feierl G., Masoud L., Valentin T., Krause R., Grisold A. J. 2011. Emergence of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase, Austria. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1: 129-130.

Zhanel G. C., Wiebe R., Dilay L., Thomson K., Rubinstein E., Hoban D. J., Noreddin A. M., Karlowsky J. A. 2007. Comparative review of carbapenems. *Drugs*, 67(7): 1027-1052.

Zhao W.-H., Hu Z.-Q. 2011. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiology*, 6, 3: 317-333.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam\\_antibiotic](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam_antibiotic)

<http://pubmlst.org/paeruginosa/>

[http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pa\\_profiles.xml](http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pa_profiles.xml) (januar 2012)

[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (januar 2012)

<http://www.hpacultures.org.uk> (november 2011)

<http://www.lahey.org/Studies/> (januar 2012)

## NECITIRANI VIRI

Dugal S., Fernandes A. 2011. Carbapenem hhydrolysing metallo- $\beta$ -lactamases: A review. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3, 3: 9-16.

Rolain J. M., Parola P., Cornaglia G. 2010. New metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 12: 1699-1701

Rossolini G. M. 2005. Acquired metallo- $\beta$ -lactamases: an increasing clinical threat. Editorial commentary. *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1557-1558.

Struelens M. J., Monnet D. L., Magiorakos A. P., Santos O'Connor F., Giesecke J., The European NDM-1 Survey Participants. 2010. New Delhi metallo- $\beta$ -lastamase-1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Eurosurveillance*, 15, 46: 1-10.

Thomson K. S. 2010. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapeneme issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 4: 1019-1025.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin, ki mi je omogočila izdelavo diplomske naloge na področju, ki me še posebej zanima in veseli. Hvala za vodenje pri delu, številne nasvete in veliko mero prilagodljivosti. Pod njenim vodstvom sem ob delu v laboratoriju zares uživala.

Zahvaljujem se recenzentki, prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec, za hiter in natančen strokovni pregled diplomskega dela.

Za zbirko sevov se zahvaljujem Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, ki so mi kadarkoli priskočili na pomoč, še posebej dr. Zdravku Podlesku in Gregorju Bajcu.

Najlepša hvala tudi Katji Molan in Sari Zidanšek za pomoč v laboratoriju, Aleksandri, Darji, Ireni in Maji pa za lepe spomine na študijske dni.

Ne nazadnje pa bi se iskreno zahvalila vsem mojim najbližjim, ki mi vedno stojijo ob strani, verjamejo vame in me spodbujajo, da dosežem svoje sanje.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGE

**Priloga A.** Zbirka kliničnih sevov, ki smo jih analizirali.

**Preglednica 1.** Zbirka kliničnih sevov *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom. Navedeni so podatki o delovni oznaki, letu izolacije, vrsti bakterije in ustanovi, od katere smo vzorec dobili in kjer je bil vzorec fenotipsko identificiran.

Delovna oznaka	Leto izolacije	Vrsta bakterije	Vir izolata
PS1			
PS2			
PS3			
PS4			
PS5			
PS6			
PS7			
PS8			Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete
PS9	NP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Univerze v Ljubljani
PS10			
PS11			
PS12			
PS13			
PS14			
PS15			
PS16			
PS MB3			Zavod za zdravstveno varstvo Maribor
Vodni lizati	TE lizati		
CF1 V	CF1 TE		
CF2 V	CF2 TE		
CF3 V	CF3 TE		
CF4 V	CF4 TE		
CF5 V	CF5 TE	NP	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete
CF6 V	CF6 TE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Univerze v Ljubljani
CF7 V	CF7 TE		
CF8 V	CF8 TE		
CF9 V	CF9 TE		
CF10 V	CF10 TE		

Se nadaljuje.



Nadaljevanje **Preglednice 1**. Zbirka kliničnih sevov *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom. Navedeni so podatki o delovni oznaki, letu izolacije, vrsti bakterije in ustanovi, od katere smo vzorec dobili in kjer je bil vzorec fenotipsko identificiran.

Delovna oznaka		Leto izolacije	Vrsta bakterije	Vir izolata
Vodni lizati	TE lizati			
CF11 V	CF11 TE	NP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
CF12 V	CF12 TE			
CF13 V	CF13 TE			
CF14 V	CF14 TE			
IMI 1		2008		
IMI 2		2009		
IMI 3		2009	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp.	
IMI 4		2006	<i>pneumoniae</i>	
IMI 5		2005		
IMI 6		2008		
IMI 7		2007	<i>Escherichia coli</i>	
IMI 8		2009		
IMI 9		2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp.	
IMI 10		2008	<i>pneumoniae</i>	
IMI 11		2008	<i>Escherichia coli</i>	
IMI 12		2007		
IMI 13		2009		
IMI 14		2008		
IMI 15		2008		Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
IMI 16		2008		
IMI 17		2009		
IMI 18		2009		
IMI 19		2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp.	
IMI 20		2008	<i>pneumoniae</i>	
IMI 21		2007		
IMI 22		2008		
IMI 23		2007		
IMI 24		2006		
IMI 25		2009		
IMI 26		2007		
IMI 28		2008		
IMI 29		2009	<i>Escherichia coli</i>	
IMI 30		2007	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp.	
IMI 31		2007	<i>pneumoniae</i>	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje **Preglednice 1**. Zbirka kliničnih sevov *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki so bili fenotipsko odporni proti karbapenemom. Navedeni so podatki o delovni oznaki, letu izolacije, vrsti bakterije in ustanovi, od katere smo vzorec dobili in kjer je bil vzorec fenotipsko identificiran.

Delovna oznaka	Leto izolacije	Vrsta bakterije	Vir izolata
IMI 32	2007	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp.	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
IMI 33	2009	<i>pneumoniae</i>	
IMI 34	2006	<i>Escherichia coli</i>	
IMI 35	2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	Zavod za zdravstveno varstvo Maribor
MB 1	NP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
MB 2	NP		

Razlaga pojmov: PS – tako smo označili seve *P. aeruginosa*; CF – tako smo pri delu označili seve *P. aeruginosa*, ki so bili izolirani pri bolnikih s cistično fibrozo; V – bakterijski lizat v vodi; TE – bakterijski lizat v pufru TE; IMI – tako smo označili seve *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki smo jih dobili iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo; MB – seve smo dobili iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor; NP – ni podatka.

**Preglednica 4.** Sevi, ki imajo zapis za encim NDM-1. Navedeni so podatki o delovni oznaki, letu izolacije, viru kužnine, vrsti bakterije in ustanova, od katere smo seve dobili.

Delovna oznaka	Leto izolacije	Vir kužnine	Vrsta bakterije	Vir izolata
20150 a	2010	urinarna pot	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani
20150 b				
20150 c				
9526 a	2009	respiratorna pot	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
9526 b				
9526 c				
ABA	2008	respiratorna pot	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
NCTC 13443	NP	NP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<a href="http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp">http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp</a>

Razlaga pojmov: NP – ni podatka

**Priloga B.** Rezultati ugotavljanja prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih vrste *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *E. coli*.

**Preglednica 1.** Ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *P. aeruginosa*.

Delovna oznaka seva	Karbapenemaze iz razreda A					Metaloencimi iz razreda B								Oksacilinaze iz razreda D								
	NMC-A	SME	IMI	KPC	GES	IMP-1	IMP-2	VIM-1	VIM-2	SPM-1	RGIM-1	SJM-1	DIM-1	Sg.1 oxa-23	Sg.2 oxa-24	Sg.3 oxa-69	Sg.4 oxa-58	Sg.6 oxa-48	Sg.7 oxa-50	Sg.8 oxa-60		
PS1	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*	
PS2	-	-	-	-	*	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*
PS3	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS4	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS5	-	-	-	-	*	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS6	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS7	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS8	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS9	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS10	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS11	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS12	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
PS13	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS14	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS15	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS16	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PS-MB3	-	-	-	-	*	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Oznaka: - sev nima gena za iskano karbapenemazo; -\* velikost pomnožka PCR je ustrezala, vendar smo po analizi nukleotidnega zaporedja ugotovili, da zaporedje ne ustreza iskanemu genu; + sev ima gen za iskano karbapenemazo

**Preglednica 2.** Ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *P. aeruginosa*, izoliranih iz bolnikov s CF.

Delovna oznaka seva	Karbapenemaze iz razreda A					Metaloencimi iz razreda B								Oksacilinaze iz razreda D								
	NMC	SME	IMI	KPC	GES	IMP-1	IMP-2	VIM-1	VIM-2	SPM-1	RGIM-1	SIM-1	DIM-1	Sg. 1 oxa-23	Sg. 2 oxa-24	Sg. 3 oxa-69	Sg. 4 oxa-58	Sg. 6 oxa-48	Sg. 7 oxa-50	Sg. 8 oxa-60		
CF1 V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
CF2 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF3 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF4 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF5 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF6 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF7 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF8 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF9 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF10 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF11 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF12 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF13 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CF14 V	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Oznaka: - sev nima gena za iskano karbapenemazo; -\* velikost pomnoška PCR je ustrezala, vendar smo po analizi nukleotidnega zaporedja ugotovili, da zaporedje ne ustreza iskanemu genu; + sev ima gen za iskano karbapenemazo

**Preglednica 3.** Ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *P. aeruginosa*, izoliranih iz bolnikov s CF.

Delovna oznaka seva	Karbapenemaze iz razreda A					Metaloencimi iz razreda B								Oksacilinaze iz razreda D								
	NMC	SME	IMI	KPC	GES	IMP-1	IMP-2	VIM-1	VIM-2	SPM-1	RGIM-1	SIM-1	DIM-1	Sg. 1 oxa- 23	Sg. 2 oxa- 24	Sg. 3 oxa- 69	Sg. 4 oxa- 58	Sg. 6 oxa- 48	Sg. 7 oxa- 50	Sg. 8 oxa- 60		
CF1 TE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
CF2 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CF3 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF4 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF5 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF6 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF7 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF8 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF9 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF10 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF11 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF12 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF13 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CF14 TE	-	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Oznaka: - sev nima gena za iskano karbapenemazo; -\* velikost pomnožka PCR je ustrezala, vendar smo po analizi nukleotidnega zaporedja ugotovili, da zaporedje ne ustreza iskanemu genu; + sev ima gen za iskano karbapenemazo

**Preglednica 4.** Ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *K. pneumoniae* in *E. coli*.

Delovna oznaka seva	Karbapenemaze iz razreda A					Metaloencimi iz razreda B								Oksacilinaze iz razreda D							
	NMC-A	SME	IMI	KPC	GES	IMP-1	IMP-2	VIM-1	VIM-2	SPM-1	RGIM-1	SIM-1	DIM-1	Sg. 1 oxa-23	Sg. 2 oxa-24	Sg. 3 oxa-69	Sg. 4 oxa-58	Sg. 6 oxa-48	Sg. 7 oxa-50	Sg. 8 oxa-60	
IMI 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Oznaka: - sev nima gena za iskano karbapenemazo; -\* velikost pomnožka PCR je ustrezala, vendar smo po analizi nukleotidnega zaporedja ugotovili, da zaporedje ne ustreza iskanemu genu; + sev ima gen za iskano karbapenemazo

Nadaljevanje **Preglednice 4.** Ugotavljanje prisotnosti genskih zapisov za karbapenemaze pri sevih bakterije *K. pneumoniae* in *E. coli*.

Delovna oznaka seva	Karbapenemaze iz razreda A					Metaloencimi iz razreda B								Oksacilinaze iz razreda D							
	NMC-A	SME	IMI	KPC	GES	IMP-1	IMP-2	VIM-1	VIM-2	SPM-1	RGIM-1	SIM-1	DIM-1	Sg. 1 oxa-23	Sg. 2 oxa-24	Sg. 3 oxa-69	Sg. 4 oxa-58	Sg. 6 oxa-48	Sg. 7 oxa-50	Sg. 8 oxa-60	
IMI 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI 35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Oznaka: - sev nima gena za določeno karbapenemazo; -\* velikost pomnožka PCR je ustrezala, vendar smo po analizi nukleotidnega zaporedja ugotovili, da zaporedje ne ustreza iskanemu genu; + sev ima gen za določeno karbapenemazo

**Priloga C.** Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR za karbapenemazne gene *bla<sub>VIM-1</sub>*, *bla<sub>VIM-2</sub>*, *bla<sub>OXA-50</sub>* in *bla<sub>OXA-60</sub>*. Navedena je delovna oznaka izolata in gen, za katerega smo ugotavljali nukleotidno zaporedje (v oklepaju). Nukleotidov označenih s črko N se ni dalo določiti.

MB3 (*bla<sub>VIM-1</sub>*)

TTANNNGANGGTTTGGGTGTATGCCGCACCCACCCCTATGGAGTCTTGATGTTAAAAGTTATTA  
GTAGTTTATTGGTCTACATGACCGCGTCTGTCATGGCTGTCGCAAGTCCGTTAGCCCATTCCGGG  
GAGCCGAGTGGTGAAGTATCCGACAGTCAACGAAATTCGGTCCGAGAGGTCCGACTTTACCAG  
ATTGCCGATGGTGTGGTTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCA  
ATGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAA  
CACAGCGCACTTCTCGCGGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCGTAACCGTGCAGTCTCC  
ACGCACTTTCATGACGACCGCGTCCGGCGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGT  
ACGCATCACCGTTCGACACGCCGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCATTCTC  
TAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTTCTATCCTGG  
TGCTGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCGTCAGCGAACGTGCTATACGGTGGT  
TGTGCCGTTTCATGAGTTGTCAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAAT  
GGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAGAGGTGCTCATTCCCGGGC  
ACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCAAAGCACAAAA  
TCGCTCAGTCGCCGAGTAGCAGATGCGCATAACATGNGCGGGNTGGTGTGTGGGTGGTGTANTNC

MB3 (*bla<sub>VIM-2</sub>*)

CNNGNACNGATGTTAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATGACCGCGTCTGTCATGGCTGTCGC  
AAGTCCGTTAGCCCATTCCGGGGAGCCGAGTGGTGAAGTATCCGACAGTCAACGAAATTCGGTCC  
GGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTGTGGTTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTG  
ATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTGAGTTGCTTTTGATTGAT  
ACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGCACTTCTCGCGGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTT  
CCCGTAACCGTGCAGTCTCCACGCATTTTCATGACGACCGCGTCCGGCGGCGTTGATGTCCTTC  
GGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGA  
ACGAGATTCCCACGCATTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCC  
AGTAGAGCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCGTCAG  
CGAACGTGCTATACGGTGGTTGTGCCGTTTCATGAGTTGTCAAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGC  
CGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCA  
GAGGTGCTCATTCCCGGGCACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACG  
TTGTCAAAGCACAAAAATCGCTCAGTCGCCGAGTAGCAGTCTTTTTTTGTTTTTTTTANAC  
CACCANNNTNAANGGGGGGGAAAGGGATTTTTGTGGGGGTAGTGAGAACCGCTTCCGTGGTGG  
GGCGAAACTATTACAACCCGGGTNNAGAGGGCCGGGGAAAGAAGACCTCCTGC

PS2 (*bla<sub>OXA-50</sub>*)

GGNNNNNNCCACAGGACCGAGCCATGCGCCCTCTCCTCTTCAGCGCCCTTCTCCTGCTCTCCG  
GGCATGCCAGGCCAGCGAATGGAACGACAGCCAGGCCGTGGACAAGCTATTCCGGCGCGGCCG  
GGGTGAAAGGCACCTTCGTCTCTACGATGTGCAGCGGCAGCGCTATGTCGGCCATGACCGGGA  
GCGCGCGGAAACTCGTTTCGTTCCCTGCCTCCACCTACAAGGTGGCGAACAGCCTGATCGGCTTA  
TCCACAGGGGCGGTTAAATCCGCCGACGAGGTTCTTCCCTATGGCGGCAAGCCCCAGCGCTTCA  
AGGCCTGGGAGCACGACATGAGCCTGCGCGACGCGATCAAGGCATCGAACGTACCGGTCTACC  
AGGAACTGGCGCGACGCATCGGCCTGGAGCGGATGCGCGCCAATGTCTCGCGCCTGGGTTACG  
GCAACGCGGAAATCGGCCAGGTTGTGGATAACTTCTGGTTGGTGGGACCGCTGAAGATCAGCG



CGATGGAACAGACCCGCTTTCTGCTCCGACTGGCGCAGGGAGAATTGCCATTCCCCGCCCCGGT  
GCAGTCCACCGTGC GCGCCATGACCCTGCTGGAAAAGCGGCCCGGGCTGGGAGCTGCACGGCAA  
GACCGGTGGTGTTCGACTGCACGCCGAACTCGGCTGGTGGGTGGGCTGGGTGAAGCGCAA  
CGAGCGGCTCTACGGCTTCGCCCTGAACATCGACATGCCCGGCGGGCAGGCCGACATCGGCAA  
GCGCGTCAACTGGGCAAGGCCAGTCTCAAGGCTCTCGGGATACTGCCCTGACGCTCTGCCGCT  
CGTCCCCCGACCAAGCCGAGTTCGGCGTGCAGTCGAAGCACCAGCCCGGTCTTGCCGTTGCA  
GCTCCCAGCCCGGGCCGCTTTTCAGCAGGGTCATGGCGCGCACGGTGGACTGCACC

PS9 (*bla<sub>OXA-50</sub>*)

GNNNCGNAATNACCCCAAGGACGAGCCATGCGCCCTCTCCTCTTCAGCGCCCTTCTCCTGCTCT  
CCGGGCATGCCAGGCCAGCGAATGGAACGACAGCCGGGCCGTGGACAAGCTATTCGGAGCGG  
CCGGTGTGAAAGGCACCTTCGTCCTTTACGATGTGCAGCGGCAGCGCTATGTCGGCCATGACCG  
GGAGCGCGCGGAAACCCGCTTCGTTCCCGCTTCCACCTACAAGGTGGCGAACAGCCTGATCGG  
TTATCCACAGGGGCGGTTAGATCCGCCGACGAGGTTCTTCCCTATGGCGGCAAACCCAGCGCT  
TCAAGGCCTGGGAGCACGACATGAGCCTGCGCGACGCGATCAAGGCATCGAACGTACCGGTCT  
ACCAGGAACTGGCGCGGCGCATCGGCCTGGAGCGGATGCGCGCCAATGTCTCGCGCCTGGGTT  
ACGGCAACGCGGAAATCGGCCAGGTTGTGGATAAATTCTGGTTGGTGGGACCGCTGAAGATCA  
GCGCGATGGAACAGACCCGCTTTCTGCTCCGACTGGCGCAGGGAGAATTGCCATTCCCCGCCCC  
GGTGCAGTCCACCGTGC GCGCCATGACCCTGCTGGAAAAGCGGCCCGGGCTGGGAGCTGCACGG  
CAAGACCGGCTGGTGTTCGACTGCACGCCGAACTCGGCTGGTGGGTGGGCTGGGTGAAGCG  
CAACGAGCGGCTCTACGGCTTCGCCCTGAACATCGACATGCCCGGCGGGCAGGCCGACATCGG  
CAAGCGCGTCAACTGGGGCAAGGCCAGTCTCAAGGCTCTCGGGATACTGCCCTGACGCTCTGG  
CGCCTCAGTCCGCCGACCAAGAGAGTTCGGGGTGGTTCTTCAGGCATCAACCTGTCTTGCGG  
TGGAAGATCCCTGCCCCGTCCGCTTTCAGTACTGTTATTGGCGAAGACGTTTGCATCGCAC

CF2TE (*bla<sub>OXA-60</sub>*)

CNNTNTAAGATGTCACGTNCGCCGTGGTGTCTGTCACGCTCCCCCTCGCGCCGCCCCGCTAAGG  
CGGAGGGGGTGTGCGCTCTGACCTGATGCGCGTGGTTCGACGACACCTGCGCCTACGGCCCCCTC  
CGAGCTGATGGACATCACCGCCGACCGTACTTATGTCGTCTATCCGGCGCGTGCCGCGCGGAGC  
ATCCATCCGGCTTCAACGTTCAAGATTCCGAACAGCCTGATCGCCTTCGACACCGGGGGCCGTGC  
GCCACTATCACGATGTGCTGCGCTAAAGCGGCAAGCCACAACCTTACCAGCAGGGGGAGCACG  
ACATGGGGTTACCCGAGGCGATTTCGCTGTGCGCCGTGCCGATCTATCAAGAAATCCCGCGCCG  
CGTTGGCTTCCACCGCATGCGAGCTTATGTCCATGCGTTCGACTACGGAAATCGCCAGCTCGGC  
AGCGCGATCGACCAGTTCTGGCTGCGTGGCCCCGCTGGAGATTTCCGCTTTC AATAAGCACGCT  
TCACCACCCGCATGGCGCTCAAACATTTGCCGGTGAAGCCGCGCACGTGGGACATGGTCCAGCG  
CATGCTGTTGATCGAGCAACAGGGCGATGCCGCGCTATATGCCAAGACCGGCGTCCCCACCGA  
AGACCAACCGGAAATCGGATGGTGGGCCGGCTGGGTGGAGCGTGCAACGCATGTCTATGCAT  
TCGCGCTGAACATCAACATGCCGCGCGAGGGCGATATGGCAAAGCACATTCCGCTGGGCAAAC  
AATTGATCGGGGCTCTCCAAGGTGTGGCCGGCACCGGGATACCACCCGCCCGTGAAGTATGCCN

**Priloga D.** Nukleotidna zaporedja pomnožkov PCR za »gospodinjske gene« *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* in *trpE* pri vzorcu MB3 *P. aeruginosa*.

*acsA*

GNCCGGNGCNCNCCTTTCTGTNCGTGGGNGTGCNGAATACTNGACGTGCCGCGTGGCGAAATC  
ATCGACAAGCACAAGGTCAACATCCTCTACACCGCGCCGACCGCGATCCGCGCGATGATGGCC  
GAAGGCAAGGCGGCGGTGGCCGGTGGCCGACGGTTCAGCCTGCGTCTGCTCGGTTCGGTGGGC  
GAGCCGATCAACCCGGAAGCCTGGCAGTGGTACTACGAGACCGTCGGCCAGTTCGCGCTGCCCG  
ATCGTCGACACCTGGTGGCAGACCGGAGACCGGCGCCTGCCTGATGACCCCGCTGCCGGGCGCCC  
ACGCGATGAAGCCGGGCTCTGCAGCCAAGCCGTTCTTCGGCGTGGTACCGGCGCTGGTGGACA  
ACCTCGGCAACCTGATCGAGGGCGCCCGGAGGGCAACCTGGTGTACCTCGACTCCTGGCCGG  
GCCAGGCGCGGACCCTGTTTCGGCGACCATGACCGCTTCGTGACACCTACTTCAAGACCTTCAA  
GGGCATGTACTTACCAGGCGACGGCGCGCGCCGCGACGAGGACGGCTACTACTGGATCACCGG  
GCGGGTGCAGCAGTGTCAACGTCTCCGGCCACCGCATGGGCACCGCCGAGGTGGAAAGCGC  
GATGGTCGCCCACCCGAAGGTCGCCGAGGCGGCGGTGGTCGGCATGCAGCACGACATCAAGGG  
GCAGTGATTTCTATGTCAGGTGAAACACCCGATGTCCGCCGACCCCAAAAGTCGACCTAGGCCG  
GGACGGTAGTCGAAGACCCCGTCGTGATGGGCACCCCTCCTCTTTTAAACAACAANGCCACCCG  
GCCGCCCGCTCGATCTTTGAGGTGGCCACACTCCGCTTTTTACCTANNNGACGCATGNGTGT  
CGGAAACCTTGAGCTCTCTCGACCGCCGTGTATCCGNTAGTAGCGTCTCTGCCNNNNNG

*aroE*

ATCGNCTGNNGNNGAGTTGAGCGAGCGGGCCACCCGGGCCGGGGCGGTGAACACCCTGATCCG  
CCTCGCCGACGGTGCCTGCGCGGCGACAACACCGACGGCGCCGGCCTGCTGCGGGACCTGAC  
GGCGAACGCGGGGTCGAGCTGCGCGGCAAGCGGGTTCCTGCTCGGCGCCGCGGTGCGGT  
GCTGGGGTGCTCGAACCCCTTCCTCGGCGAGTGCCCGCGGAGTTGCTGATCGCCAACCGCACG  
GCGCGGAAGGCCGTGGACCTGGCCGAGCGGTTCCGCCGACCTCGGCGCGGTGCACGGCTGCGGT  
TTCGCCGAGGTGCAAGGGCCTTTCGACCTGATCGTCAACGGCACCTCGGCCAGTCTTGCCGGCG  
ACGTGCCCGCGCTGGCGCAGAGCGTGATCGAGCCCGGCCGTACCGTCTGCTACGACATGATGTA  
TGCCAAGGAACCGACTGCCTTCAACCGCTGGGCCGCGGAACGCGGTGCGGCGCGTACCCTGGA  
TGGCCTGGGCATGCTGGTGGAGCAGGCCGCGGAGGCATTCTCCTCTGGCGCGGCGTGCGTCTC  
GCCTCGGCGCCAGTGTGGAGACGCTGCGCCGACAGTTGGCAACTGTCTGAGTTGTCAGGCGGA  
ATTTGAGACGTACGTCTCAAGTTGGCTTCTATCTGACATGTAGGAATCACAAAACCCCGGGTA  
AAANCTGGGCCCCCAAGAGGCGGGAGAGCGCGGAAACCCCTGCCGCTGCGTTGCAGGGT  
GATTATCAGGCAACGCCGGCGGTTTAGGGAAAGGCCGCGGAACAGCGGCGACTTGTGCGGGG  
GAGGGGTGGGCCTAATAGGAAAAACGGCCCTAGGGATTTTTTTTTGGGAGTGAGAGGGA  
AGCGCAGTCGCCCCCTGTGGAGAGGCTGCGGCGACGGCTGGCAACTGATCTGAGTGC

*guaA*

GNNTTCGCGGCGTGNACTCCTCGGTGGTCGCCGCGCTGCTGCACAAGGCCATCGGGGACCAACT  
GACCTGCGTGTTCGTCGACAACGGCCTGCTGCGCCTGCACGAAGGTGACCAGGTGATGGCCATG  
TTCGCCGAGAACATGGGCGTGAAGGTGATCCGCGCCAACGCCGAGGACAAGTTCCTCGGTTCGC  
CTGGCCGGCGTCGCCGACCCGGAAGAGAAGCGCAAGATCATCGGCCGCACCTTCATCGAAGTC  
TTCGACGAAGAAGCCACCAAGTTGCAGGACGTGAAGTTCCTCGCCCAGGGCACCATCTACCCCG  
ACGTGATCGAGTCGGCCGGCGCCAAGACCCGGCAAGGCCACGTGATCAAGTCGCACCACAACG  
TCGGCGGCCTGCCGGAGGACATGCAGTTCGAACTGGTCGAGCCGCTGCGCGAACTGTTCAAGG  
ACGAAGTGCGCAAGATCGGCCTGGAGCTGGGCCTGCCCTACGACATGGTCTACCGCCACCCGTT  
CCCCGGCCCCGGGCTGGGCGTGCGCATCCTCGGCGAGGTGAAGAAGGAGTACGCCGACCTGCT  
GCGCCAGGCCGACCACATCTTCATCGAGGAACTGCGCGCCTTCGATTGGTACCACAAGACAGN  
NGGGGGCTTTNNAACCCGGCCCCCTTGGGGGAAGGACCTCCCCGACGAAATTTGGTTCGGAGGC  
GGCTGCGGCGAGTGGTTAACGGACGAAGTGCAGAAAAACGCGCCGGGAAGATGGGGCCTGG  
CCCCACGACGGGGTGGGCGGCCTCCCGTTTGACGTTGCAGGGCCTGAGTAGTGCGCGGGCCT  
CGTCGAGGCATGAGCAGGGAGTACGGCAGACTTGCTGTGCTGGGCAGGATGTGTTCATGCATGG  
AGGAATGCGGGATCTGGTGTACGCTGCNNCNNNNNGAGACGACNNNTCCCGCGGGCTACCC

*mutL*

TACTCAGCGCTGGCGCTGGCCCGTTTCGACGTGGCTTTCCACCTGCGCCACAACGGCAAGACCA  
TCTTCGCCCTGCACGAGGCGCGAGACGAGCTGGCCCGCGCGCGCCGGGTTCGGCGCGGTGTGCG  
GCCAGGCATTCCTCGAGCAGGCGCTGCCGATCGAGGTTCGAGCGCAACGGCCTGCACCTGTGGG  
GCTGGGTTCGGCTTGCCGACCTTCTCCCGCAGCCAGCCGGACCTGCAGTACTTCTATGTGAACGG  
GCGCATGGTGCGCGACAAGCTGGTTCGCCACGCGGTGCGCCAGGCTTATCGCGACGTGCTGTAC  
AACGGCCGGCATCCGACCTTCGTGCTGTTCTTCGAAGTCGATCCGGCGGTGGTGGACGTCAACG  
TGCACCCGACCAAGCACGAAGTTCGTTCCGTGACAGCCGGATGGTCCATGACTTCCTCTATGG  
CACCTAGAATCATGATGAACGTCAGCAATCCGATCGCGCTTTCAATTTCCGCCACTTGCCGAA  
CGAAGGCGTGGGCCTGGCCCGCCTTGAATTCATCATCAAGCGCATGATCGGCGTGCACCCCAAG  
GCATTGCTGATCTTCCCCGGCCTGCCGCCGGACATCAATGAAACCGTGCACAAACCCATTTTTA  
GCTATCCCCATCCCCGCCGAATTCTACGTNAGAACCTGGTGGAAAGGTATCCTTCCCCTGGGCA  
CTGTTTTGTGGGCGGAAGAAAGTTCATCGCCGACCTGTGGCACTCTGCCTGCAATGAGTGCACCG  
ACCTGATGGGGCTCACCTCTACTAGTGGAGTGCCTTGGTTCGACCAACCCCGTCGAGGGGGCGGG  
GAAACGGGGGCCAGGACGATTTTCCAAGAATTTCTTGGGCGGCCGAGGGGGGGGGGCTCGAC  
TCTCCTCCTCCCCCAAGAAAAAAGAACCTGGGAGGGGGGGGGATGGAACCC

*nuoD*

GNNGNNCANNATCNCGGCGACACCCGTCCGCCACGGCGCGTTCGCGATCATCCTGCAACTGG  
ACGGCGAGGAGATCATCGACTGCGTCCCGGAGATCGGCTACCACCACCGCGCGCCGAGAAGA  
TGGCCGAGCGCCAGTCCCTGGCACAGTTTCATCCCTACACCGACCGCATCGACTACCTCGGCGG  
GGTATGAACAACCTGCCCTACGACTCTCGGTGGAGAAGCTCGCCGGGATCAAGGTGCCGCA  
GCGGGTGCACGTGATCCGGATCATGATGGCGGAGTTCCTCCGTATCCTGAACCACCTGCTGTAC  
CTGGGCACCTATATCCAGGACGTCCGGCGCCATGACCCCGGTGTTCTTCACCTTCACCGACCGCC  
AGCGCGCCTACAAGGTGGTCGAGGCCATACCCGGCTTCGCTGCACCCGGCCTGGTACCGCAT  
CGGCGGCGTCCGCCACGACCTGCCGCGCGGCTGGGACAAGCTGGTCCGCGAGTTCCTCGACTGG  
ATGCCAAGCGCCTCGACGAGTACGAGACCGCGGCCCTGAAGAACAGCATCCTGCGCGGCCGG  
ACCATCGGCGTCCGCCAGTACTACCAAGGAAGCCCTCGAGTGGTGCACCACCGGCGCCGGC  
CTGCGCGCCACCGGTTGCGACTTCGACCTGCGCAAGGCCCGCCCTACTCCGGCTACGAGAAT  
TCGAGTTCGAGGTACCGCTGGCCACAACGGCGACGCCTACGACCGCTGCATGGTCAAAATGG  
GGCGAGAACCC

*ppsA*

TNNNAGNNGCCCGGAAACGTGAAGAGCCGCGCCNCGGCCNCGGTCATGGAAGCGCTACCTGCT  
GAAAGAGAAGGGGACCGTCCTGGTGGAAAGGGCGTGCCATCGGCCAGCGCATCGGTGCCGGTCC  
GGTCAAGGTGATCAACGACGTGTTCGGAAATGGACAAGGTCCAACCGGGTGACGTCTGGTCTC  
CGACATGACCGACCCGGACTGGGAGCCGGTGATGAAGCGCGCCAGCGCCATCGTCACCAAC  
CGCGGCGGGCGTACCTGCCACGCGGGCGATCATCGCTCGGAACTGGGCATCCCGGGCGGTGGTC  
GGTTGCGGCAACGCCACCCAGATCCTGCAGGATGGCCAGGGGGTGACCGTTTCCTGTGCCGAA  
GGCGATAACCGCTTCATCTTCAAGGCGAACTCGGTTTCGATGTGCGCAAGAACTCGGTCGACG  
CCATGCCCGACCTTCCGTTCAAGATCATGATGAACGTCGGCAATCCCGATCGCGCTTCGATTTT  
GCCCAGTTGCCGAACGAAGCGTGGGCCTGGCCCGCCTCGAATTCATCATCAACCGCATGATCG  
GCGTGACCCCAAGGCATTGCTGAACCTTCGCCGGCCTGCCGGCGGACATCAAGGAAAGCGTGG  
AGAAGCGCATCGCCGGCTATCCCGATCCGGTCGGCTTCTACGTCGAGAAGCTGGTGGAAAGGCAT  
CAGCACCTGGCCGCGGGCTTCTGGCCGAAGAAGGTCATCGTGCGCCTGTCCGACTTCAAGTCC  
AATGAGTACGCCAACCTGATCGGCGGCAAGCTCTACGAGCGAGAAAAAAAAACCCACAANN  
NTGGGGCGGATGGGATGGTCCCCTCCGGGGGCCAGGTGTTTGCCCAAAAAAAAAAGGGCCTGG  
GTGGGCGTCCACGTTACCTCCGATGAGTATNACGAACTAGATGGGCGGCATGNCTACGAGC

*trpE*

TNNNCTNCNGAGTGCTGGTACGGGTTCGAGGATGGCCTGGTGACGGTGCGCCCGATCGCCGGCA  
CCCGTCCGCGCGGGATCAACGAAGAGGCCGACCTGGCGCTGGAGCAGGATCTGCTGTCCGACG  
CCAAGGAGATCGCCGAGCACCTGATGCTGATCGACCTGGGGCGCAACGACGTGGGGCGGGTGT  
CCGATATCGGCGCGGTGAAGGTCACCGAAAAAATGGTGATCGAACGTTACTCCAACGTCATGC  
ACATCGTGTCCAACGTCACCGGGCAATTGCGCGAGGGGCTCAGCGCGATGGACGCGCTGCGGG  
CGATCCTGCCGGCGGGTACGCTGTCCGGCGCGCCGAAGATCCGCGCCATGGAGATCATCGACG  
AGCTGGAGCCGGTCAAGCGTGGAGTCTACGGCGGCGCGGTTCGGCTACCTGGCATGGAACGGCA  
ACATGGACACCGCCATTGCCATCCGCACCGCGGTGATCAAGAACGGTGAACCTCCACGTGCAGG  
CCGGCGGCGGTATCGTTGCCGACTCGGTGCCGGCGCTGGAGTGGGAAGAAACCATCAAAAGNC  
GGCCGGGAANGTNCTTGCTGAACTTCGCCGGGCTACCGGGGAGAGGTGCGGGAAAGCGGGTAG  
GTACCTGTCTGGAACTAGCCGAAAGGGGGTGGGTTCTGCCTCCAGGACCGGGGTGGATCGGG  
AAGGGTGAATTCCTGGGGCGGCCGGCGGGGTTTCTTAGCCCTACTGGGGGACGACGTTGGG  
AGAGAAGAAACCATCAACTATTGGCGAACCGCGTGGGGCGGATGCCCATCTCGCCTGCGGGTG  
GGAGTTACCGAATCTTGAGTGCGCGAAGCGTACGGCAATGGCGGGCTCATGTTGTCGATCATGC  
CGGTAATTACGCGACGCGCTAGACTCACGCTGACGGCTCGCTCGATCATGATTCATGGACGGTA  
T

**Priloga E.** Nukleotidno zaporedje začetnih ohranjenih segmentov 5'CS in 3'CS integrona razreda 1 pri vzorcu MB3 *P. aeruginosa*.

MB3 INT 5'CS

CNNNGNTGATGTTTGGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAA  
ACAAAGTTATGCCGCACCCACCCCTATGGAGTCTTGATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGT  
CTACATGACCGCGTCTGTTCATGGCTGTCGCAAGTCCGTTAGCCCATTCGGGGGAGCCGAGTGGT  
GAGTATCCGACAGTCAACGAAATTCGGTTCGGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTG  
TTTGGTTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATTGTC  
CGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACTTC  
TCGCGGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACTTTCATGA  
CGACCGCGTTCGGCGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTGC  
ACACGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCATTCTCTAGAAGGACTCTCA  
TCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTTCGA  
CCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCGTACGCGAACGTGCTATACGGTGGTTGTGCCGTTTCATGA  
GTTGTCAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCACCTCCGTT  
GAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAGAGGTGCTCATTCCCGGGCACGGTCTACCGGGC  
GGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCAAAGCACACAAAATCGCTCAGTCGCCG  
AGTAGCAGATGCGGCATAACAAATCGTTGGAGCGGGACTTTTGTCTACGCAGG

MB3 INT 3'CS

TATNCGTAAANTATGTGCTTAGTGCATCTAACGCCGCCATAAGTTGCGGCTTTGGAGTTGATTGT  
TTTGTGGTAGCGTAGCGTTAAACCACAAAACAAGCGACGGAAAAGCCGTCAACTTGATGGCCTT  
GTTAGCCTTATCATCGCGACTGTGATGTATAAACGTCAAAAATTGAATGACCAATTTTAAACA  
TCGCATCATTTGCTCTGCCATTGAAGCCTGTGTTTGGAGCTAAATAGATGCTCACAATAATTGGG  
GCTTGATGCTCACTCCACACAACCTGCTGTAATACTCCGAGCACCAATCCGCCAGCACCTGAGC  
GACCCGCATGGTTCCGTCCCGCCGGTAAACTGATTTTTTGAATTACCCCTGACTTGATTGTTT  
ACCATCCTGACTCTAGTTTTTTCTGGTTCATTTAGATAGCGTGCATCCCAATAAAAATTAATTC  
AAAGTACTGGCTATTGCCTTAGGAGTTGTCGTATCCCTCAAATCACCGAGCTTACCTTCATTTAA  
ATCAGGCTCAATACGGTCTAGACGAGTCTTTTGTCCCAATTTGTCTTAAAAAATCAGCAACG  
CCTTTGGGGCCCCCTACTGCACTTAGGATGATATTTGCCGAGTATTATCACTTGTAGTCATAGT  
TGCTAAAGCACGCATCATCGAGTGTGATTGCCTGCCCTACTTGCTTTTTTCTATACGGGGAATAGG  
TCACAAGATCTGCTTTCCAATCTCCACTGTACTATTGGGATTAACTTTTCCCTGCTCACATCCTA  
CAGTAATCCACGCAAGCTACTGTATTAAGACTTGTACGGGAAGCGCTGATTGC

**Priloga F.** Povprečno število transkonjugant in povprečno število recipienta ter izračunane frekvence konjugacije.

**Preglednica 1.** Povprečno število transkonjugant in povprečno število recipienta ter izračunane frekvence konjugacije.

---

<b>Povprečno število recipienta J53</b>	$1,75 \times 10^9$
---	--------------------

---

<i>Donor × recipient</i>	<b>Povprečno število transkonjugant</b>	<b>Frekvenca konjugacije</b>
<b>20150 × J53</b>	54	$3,1 \times 10^{-8}$
<b>9526 × J53</b>	$5,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^{-4}$
<b>ABA × J53</b>	10	$5,7 \times 10^{-9}$
<b>NTCT × J53</b>	$8,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^{-3}$

---