

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasmina BOŽIČ

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA PROTI PENICILINU  
ODPORNIH INVAZIVNIH IZOLATOV BAKTERIJE  
*Streptococcus pneumoniae*, IZOLIRANIH V  
SLOVENIJI V LETU 2004**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasmina BOŽIČ

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA PROTI PENICILINU ODPORNIH  
INVAZIVNIH IZOLATOV BAKTERIJE *Streptococcus pneumoniae*,  
IZOLIRANIH V SLOVENIJI V LETU 2004**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MOLECULAR TYPING OF INVASIVE PENICILLIN RESISTANT  
*Streptococcus pneumoniae* STRAINS ISOLATED IN SLOVENIA IN  
2004**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za bakteriologijo na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije v Ljubljani.

Študijska komisija Univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorico dr. Metko Paragi in za recenzenta prof. dr. Tomaža Accetta.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Somentorica: dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol.

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol.

Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo

Član: doc. dr. Tomaž Accetto, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Jasmina Božič se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jasmina Božič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.61:579.862:616.98(043)=163.6  
KG *Streptococcus pneumoniae*/invazivne pnevmokokne bolezni/odpornost proti antibiotikom/odpornost proti penicilinu/mednarodno razširjeni večkratno odporni kloni/molekularna tipizacija/PFGE  
AV BOŽIČ, Jasmina  
SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/PARAGI, Metka (somentorica)/ACCETTO, Tomaž (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2010  
IN MOLEKULARNA TIPIZACIJA PROTI PENICILINU ODPORNIH INVAZIVNIH IZOLATOV BAKTERIJE *Streptococcus pneumoniae*, IZOLIRANIH V SLOVENIJI V LETU 2004  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 78 str., 9 pregл., 11 sl., 1 pril., 91 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI *Streptococcus pneumoniae*, pnevmokok, je pomemben človeški patogen in eden glavnih povzročiteljev obolenosti in umrljivosti po vsem svetu. Povzroča številne bolezni, od običajno manj nevarnih okužb zgornjih dihal do resnih invazivnih okužb, kot so pljučnica z bakterijom, meningitis in sepsa. Okužbe s pnevmokoki običajno zdravimo z antibiotiki, kot je penicilin, vendar je v zadnjih desetletjih odpornost pnevmokokov proti penicilinu in nekaterim drugim antibiotikom narasla in postala večji svetovni javnozdravstveni problem. Široka poraba antibiotikov poveča seleksijski pritisk in privede do pojava odpornih bakterij. Znano je, da v populaciji proti antibiotikom odpornih pnevmokokov prevladuje manjše število uspešnih odpornih klonov. Namen naše raziskave je bil ugotoviti vzrok velikega porasta proti penicilinu odpornih invazivnih sevov *S. pneumoniae* v Sloveniji v letu 2004, ko se je njihov delež povzpel iz 17,3 % v letu 2003 na kar 27,5 %. V raziskavo smo vključili 47 invazivnih proti penicilinu odpornih pnevmokoknih sevov. Z gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE) smo analizirali 41 sevov skupaj s sedmimi predstavniki mednarodnih odpornih in večkratno odpornih klonov pnevmokokov tako, da smo med seboj primerjali njihove restriksionske vzorce DNA. Rezultati molekularne analize z metodo PFGE so pokazali, da večina sevov serotipov 14 in 9V pripada istemu klonu ali klonskemu kompleksu kot mednarodno razširjeni klon pnevmokokov Spain<sup>9V</sup>-3. Dokazali smo tudi prisotnost manjšega klonskega kompleksa pnevmokoknih sevov serotipa 6A in 6B, ki je soroden mednarodno razširjenemu klonu Poland<sup>6B</sup>-20. Izsledki naše raziskave kažejo na to, da je za pojав porasta odpornosti proti penicilinu v Sloveniji v letu 2004 odgovorna razširitev klonskega kompleksa Spain<sup>9V</sup>-3.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.61:579.862:616.98(043)=163.6  
CX *Streptococcus pneumoniae/invasive pneumococcal diseases/antibiotic resistance/penicillin resistance/multidrug-resistant international clones/molecular typing/PFGE*  
AU BOŽIČ, Jasmina  
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/PARAGI, Metka (co-advisor)/ACCETTO, Tomaž (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2010  
TI MOLECULAR TYPING OF INVASIVE PENICILLIN RESISTANT *Streptococcus pneumoniae* STRAINS ISOLATED IN SLOVENIA IN 2004  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO XIII, 78 p., 9 tab., 11 fig., 1 ann., 91 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB *Streptococcus pneumoniae*, the pneumococcus, is an important human pathogen and a major contributor to morbidity and mortality worldwide. It causes a wide variety of diseases, from normally harmless upper respiratory infections to serious invasive infections, such as pneumonia with bacteremia, meningitis and septicemia. Pneumococcal infections are in general treated with antibiotics such as penicillin, but over the last decades antibiotic resistance to penicillin and some other antibiotics increased and became a serious public-health problem worldwide. Wide use of antibiotics has been identified increasingly as the main selective pressure driving the emergence of resistant bacteria and it has been shown, that a small number of highly successful resistant clones dominate the population of antibiotic-resistant pneumococci. The aim of our study was to determine the cause of an observed increase in penicillin resistant invasive *S. pneumoniae* isolates in Slovenia in 2004, when the share of them rose from 17.3 % in 2003 to 27.5 %. 47 invasive penicillin resistant pneumococcal isolates were included in the study. By pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) we analyzed 41 isolates together with seven selected representative strains of international penicillin-resistant and multidrug-resistant pneumococcal clones and compared their DNA restriction profiles. Molecular analysis by PFGE showed that the majority of serotype 14 and 9V isolates belonged to the same clone or clonal cluster as the internationally spread pneumococcal clone Spain<sup>9V</sup>-3. Other minor clonal cluster of serotype 6A and 6B isolates was found as well, which is related to internationally successfully spreading clone Poland<sup>6B</sup>-20. Our data suggest that a major reason for the increase of penicillin resistant invasive isolates in Slovenia in 2004 was the spread of the Spain<sup>9V</sup>-3 clonal cluster.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</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 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 KLASIFIKACIJA BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> .....	3
2.2 MORFOLOŠKE IN DRUGE ZNAČILNOSTI BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> .....	4
2.3 GENOM IN SPOSOBNOST KOMPETENCE BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> .....	7
2.4 PATOGENEZA BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> .....	7
2.4.1 Kolonizacija in nastanek okužbe.....	8
2.4.2 Virulentni dejavniki .....	10
2.4.2.1 Polisaharidna kapsula.....	10
2.4.2.2 Celična stena .....	12
2.4.2.3 Beljakovine in drugi virulentni dejavniki .....	12
2.5 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OKUŽBO Z BAKTERIJO <i>S. pneumoniae</i> .....	14
2.6 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z BAKTERIJO <i>S. pneumoniae</i> .....	15
2.6.1 Epidemiologija in spremljanje pnevmokoknih invazivnih okužb v Sloveniji .....	17
2.7 ODPORNOST BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> PROTI ANTIBIOTIKOM .....	18
2.7.1 Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom .....	20
2.7.1.1 Mehanizem odpornosti proti penicilinu .....	21
2.7.2 Pojav in širjenje odpornosti pnevmokokov proti antibiotikom .....	22
2.7.3 Koncept klonov .....	24
2.8 ZDRAVLJENJE PNEVMOKOKNIH OKUŽB.....	27

2.9	PREPREČEVANJE PNEVMOKOKNIH OKUŽB .....	27
2.9.1	Prihodnost v razvoju cepiv .....	29
2.10	TIPIZACIJA .....	30
2.10.1	Pomen tipizacije pnevmokoknih sevov .....	31
2.10.2	Genotipske tipizacijske metode .....	31
	2.10.2.1 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju .....	32
3	MATERIALI IN METODE .....	34
3.1	MATERIALI .....	34
3.1.1	Vzorci .....	34
3.1.2	Standardni sevi .....	35
3.1.3	Laboratorijski pribor in oprema .....	36
3.1.4	Gojišče, raztopine in reagenti .....	37
3.2	METODE .....	38
3.2.1	Analiza kromosomske DNA z gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE) .....	38
3.2.1.1	Priprava bakterijskih sevov in bakterijske suspenzije .....	38
3.2.1.2	Priprava agaroznih blokcev .....	40
3.2.1.3	Restrikcija genomske DNA v agaroznih blokcih .....	41
3.2.1.4	Gelska elektroforeza .....	41
3.2.1.4.1	Vstavljanje agaroznih blokcev v gel za elektroforezo .....	41
3.2.1.4.2	Priprava PFGE sistema za analizo .....	42
3.2.1.4.3	Pogoji elektroforeze .....	42
3.2.1.4.4	Barvanje in fotografiranje gela .....	42
3.2.1.4.5	Kontrola izvajanja postopkov .....	43
3.2.1.5	Analiza rezultatov .....	43
3.2.1.5.1	Vizualna analiza restrikcijskih vzorcev DNA .....	43
3.2.1.5.2	Analiza restrikcijskih vzorcev DNA s pomočjo računalniškega programa .....	44
4	REZULTATI.....	45
4.1	ZBIRNA PREGLEDNICA .....	45
4.1.1	Serotipizacija .....	45
4.1.2	Določanje odpornosti proti antibiotikom .....	45

4.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA Z METODO PFGE.....	46
4.2.1 Analiza restrikcijskih vzorcev DNA proti penicilinu odpornih invazivnih sevov, izoliranih v Sloveniji v letu 2004 .....	46
4.2.2 Analiza podobnosti restrikcijskih vzorcev DNA med sevi, izoliranimi v Sloveniji v letu 2004, in izbranimi predstavniki mednarodnih odpornih klonov iz zbirke ATCC .....	47
4.2.2.1 Analiza podobnosti med sevi serotipov 14, 9V ter predstavniki klonov England <sup>14</sup> -9, Spain <sup>14</sup> -5 in Spain <sup>9V</sup> -3 .....	48
4.2.2.2 Analiza podobnosti med sevi serotipov 6A, 6B ter predstavnikoma klonov Spain <sup>6B</sup> -2 in Poland <sup>6B</sup> -20 .....	50
4.2.2.3 Analiza podobnosti med sevi serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F ter predstavnikoma klonov Taiwan <sup>19F</sup> -14 in Hungary <sup>19A</sup> -6 .....	52
4.2.2.4 Analiza dendrograma vseh tipiziranih sevov in predstavnikov mednarodnih odpornih klonov .....	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	56
5.1 RAZPRAVA.....	56
5.1.1 Serotipizacija.....	57
5.1.2 Določanje odpornosti proti antibiotikom .....	57
5.1.3 Molekularna tipizacija z metodo PFGE .....	61
5.2 SKLEPI.....	64
6 POVZETEK.....	65
7 VIRI .....	67
ZAHVALA	
PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Odpornost invazivnih sevov <i>S. pneumoniae</i> v Sloveniji v letih 2002 – 2006 (Paragi in sod., 2007).....	19
Preglednica 2: Mehanizmi odpornosti <i>S. pneumoniae</i> proti antibiotikom (Charpentier in Tuomanen, 2000; Ambrose in Stephens, 2004; Montagnani in sod., 2007; Pletz in sod., 2007) .....	21
Preglednica 3: Značilnosti sedmih predstavnikov mednarodno razširjenih klonov .....	25
Preglednica 4: Število proti penicilinu, cefotaksimu in ceftriaksonu odpornih invazivnih sevov.....	45
Preglednica 5: Število proti eritromicinu, kloramfenikolu, tetraciklinu, vankomicinu, klindamicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom odpornih invazivnih sevov.....	46
Preglednica 6: Število in delež proti antibiotikom večkratno odpornih invazivnih sevov..	46
Preglednica 7: Analiza podobnosti med sevi serotipa 14, 9V ter predstavniki klonov Spain <sup>9V</sup> -3, Spain <sup>14</sup> -5 in England <sup>14</sup> -9 .....	49
Preglednica 8: Analiza podobnosti med sevi serotipa 6A, 6B ter predstavnikoma klonov Spain <sup>6B</sup> -2 in Poland <sup>6B</sup> -20 .....	50
Preglednica 9: Analiza podobnosti med sevi serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F ter predstavnikoma klonov Taiwan <sup>19F</sup> -14 in Hungary <sup>19A</sup> -6 .....	52

## KAZALO SLIK

Slika 1: Vrstični elektronski posnetek para kokov <i>S. pneumoniae</i> (Todar, 2009) .....	1
Slika 2: <i>S. pneumoniae</i> na krvnem agarju na katerega je položen disk optohina (Todar, 2009) .....	1
Slika 3: Reakcija nabrekanja kapsule (Todar, 2009).....	1
Slika 4: Shematični prikaz celične stene pnevmokokov, TA – teihoična kislina, LTA – lipoteihoična kislina, Hyl – hialuronidaza, PsaA – pnevmokokni površinski antigen A, CBDs – vezavno mesto za holin-vezavne beljakovine, PBP – penicilin vezoe beljakovine (Di Guilmi in Dessen, 2002) .....	6
Slika 5: Patogeneza pnevmokokne okužbe (Bogaert in sod., 2004) .....	8
Slika 6: Virulentni dejavniki pnevmokokov, Hyl – hialuronidaza, LytA - pnevmokokni avtolizin, Eno – enolaza, PavA – faktor adhezije in virulence A (Kadioglu in sod., 2008) .....	13
Slika 7: Shema poteka dela.....	1
Slika 8: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 14 in 9V ter predstavnikov klonov England <sup>14</sup> -9, Spain <sup>14</sup> -5 in Spain <sup>9V</sup> -3 .....	48
Slika 9: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 6A, 6B in predstavnikov klonov Spain <sup>6B</sup> -2 in Poland <sup>6B</sup> -20.....	1
Slika 10: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F in predstavnikov klonov Taiwan <sup>19F</sup> -14 in Hungary <sup>19A</sup> -6 .....	1
Slika 11: Dendrogram podobnosti vseh proti penicilinu odpornih invazivnih sevov in predstavnikov mednarodnih odpornih klonov pnevmokokov, tipiziranih z metodo PFGE.....	55

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Zbirna preglednica: prikaz odpornosti proti antibiotikom 47 invazivnih sevov *S. pneumoniae*, izoliranih v Sloveniji v letu 2004

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	angl. American Type Culture Collection
bp	bazni par
CBP	holin-vezavne beljakovine (angl. choline-binding proteins)
CLSI	angl. Clinical and Laboratory Standards Institute
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DHPS	dihidropteroat sintaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
Fc	podenota imunoglobulina sestavljeni iz konstantnih delov obeh težkih verig
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipa b
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
IgA	imunoglobulin razreda A
IVZ RS	Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije
KA	krvni agar
kbp	kilo bazni par
LTA	lipoteihoična kislina
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov (angl. multilocus sequence typing)
NaCl	natrijev klorid
PBP	penicilin vezocene baljakovine (angl. penicillin-binding proteins)
PCV	konjugirano pnevmokokno cepivo (angl. pneumococcal conjugate vaccine)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. pulsed-field gel electrophoresis)
PMEN	angl. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network
PPV	polisaharidno pnevmokokno cepivo (angl. pneumococcal polysaccharide vaccine)
rRNA	ribosomska RNA (angl. ribosomal RNA)
rPAF	faktor aktivacije trombocitov
ST	sekvenčni tip

TA	teihoična kislina
TLR	Tollu-podoben receptor (angl. Toll-like receptor)
TNF	faktor tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)
UPGMA	metoda neutrežne aritmetične sredine (angl. unweighted pair group method using arithmetic averages)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

## 1 UVOD

Bakterija *Streptococcus pneumoniae*, predhodno imenovana *Diplococcus pneumoniae*, je danes splošno znana preprosto kot pnevmokok. Prvi sev so odkrili ob koncu 19. stoletja in od takrat je prepoznan kot eden glavnih povzročiteljev obolenosti in umrljivosti po vsem svetu (Gray in Musher, 2008). Kljub danes veliki porabi različnih antibiotikov in razpoložljivih cepiv za zdravljenje in preprečevanje pnevmokoknih okužb in bolezni, obolenost in umrljivost ostaja visoka, predvsem v državah v razvoju (Hoskins in sod., 2001; WHO, 2007).

Pojav proti penicilinu odpornih in večkratno odpornih sevov pnevmokokov je postal velik svetovni problem, saj otežuje zdravljenje in povečuje tveganje za smrtni izid bolezni (Sjöström in sod., 2007). Od prvega opisa pnevmokokov z zmanjšano občutljivostjo za penicilin v Avstraliji v poznih 60. letih dvajsetega stoletja so o njihovem odkritju in porastu poročali iz različnih delov sveta. Pojav bolezni, ki jih povzročajo proti penicilinu odporni in večkratno odporni sevi pnevmokokov, je sprožil potrebo po njihovi identifikaciji in učinkovitem epidemiološkem nadzoru z določitvijo prevalence posameznih sevov ter ugotavljanjem njihovega geografskega širjenja (McGee in sod., 2001).

### 1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA

V okviru diplomskega dela smo želeli ugotoviti vzrok velikega porasta proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pneumokokov v Sloveniji v letu 2004, ko se je njihov delež povzpel iz 17,3 % v letu 2003 na kar 27,5 % (Paragi in sod., 2007). Z gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (angl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) smo analizirali proti penicilinu odporne invazivne seve, izolirane v Sloveniji v letu 2004 in dobljene restrikcijske profile primerjali s profili sevov izbranih predstavnikov mednarodnih odpornih in večkratno odpornih klonov, dostopnih v javnih zbirkah sevov. Želeli smo ugotoviti, ali so proti penicilinu odporni sevi pneumokokov med seboj genetsko sorodni in ali so sorodni kateremu izmed odpornih klonov, razširjenih po svetu.

Predpostavili smo, da je velik porast proti penicilinu odpornih invazivnih sevi pneumokokov v letu 2004 posledica razširitve vsaj enega mednarodnega odpornega klena v Sloveniji.

## 2 PREGLED OBJAV

Bakterijo *Streptococcus pneumoniae* je leta 1880 v laboratoriju prvi izoliral George M. Sternberg v Združenih državah Amerike (ZDA). Le nekaj mesecev za njim jo je izoliral tudi Louis Pasteur v Franciji, ki je svoja opažanja leta 1881 tudi prvi predstavil širši javnosti. Oba znanstvenika sta obstoj bakterij dokazala v krvi zajcev, v katere sta vbrizgala slino človeka. Že pred njunim opisom je bilo v literaturi mogoče zaslediti poročila raziskav, v katerih so opisovali diplokoke suličaste oblike, vendar sta jih šele Sternberg in Pasteur izolirala, identificirala in pokazala, da te bakterije lahko povzročijo bolezen pri živalih. Bakterijo sta znala gojiti in vitro in tudi opisi morfologije njunih sevov so bili podobni. Opisala sta jo kot diplokoka s polisaharidno kapsulo, a nadela sta ji različni imeni. Pasteur jo je poimenoval »microbe septicémique de la salive« (septični mikrob sline) in Sternberg *Micrococcus pasteurii*. Leta 1886 ji je nemški zdravnik Fraenkel pripisal danes splošno znano ime *Pneumococcus*, pnevmokok, saj je bakterija postala prepoznavna kot najpogostejši povzročitelj pljučnice. V letu 1920 so jo preimenovali v *Diplococcus pneumoniae* zaradi značilne mikroskopske slike razmaza sputuma, barvanega po Gramu, na kateri so vidni koki, ki se pojavljajo v parih. Šele leta 1974 je pnevmokok dobil svoje sedanje ime – *Streptococcus pneumoniae* zaradi svoje značilne rasti v obliki krajših verižic v tekočem mediju (Tuomanen in sod., 2004; Gray in Musher, 2008).

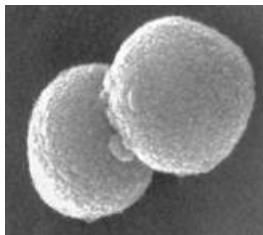
Bakterijo *S. pneumoniae* so odkrili v zlati dobi mikrobiologije, ki se je začela v zadnji četrtni 19. stoletja. Pnevmonokok, eden glavnih povzročiteljev bolezni pri človeku, je bil eden izmed prvih izoliranih in podrobno opisanih patogenih mikrobov. Tako ni presenetljivo, da je igral pomembno vlogo pri razvoju moderne bakteriologije, genetike, imunologije, antimikrobne terapije in cepiv (Gray in Musher, 2008).

### 2.1 KLASIFIKACIJA BAKTERIJE *S. pneumoniae*

Bakterijo *S. pneumoniae* uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Bacilli*, red *Lactobacillales*, družino *Streptococcaceae* in rod *Streptococcus* (Vos in sod., 2009). Glede na hemolizo, ki jo tvori na krvnem agarju (KA), pripada skupini alfahemolitičnih streptokokov (Murray in sod., 2002).

## 2.2 MORFOLOŠKE IN DRUGE ZNAČILNOSTI BAKTERIJE *S. pneumoniae*

Pnevmonoki so po Gramu pozitivni koki, ki se običajno pojavljajo v parih kot diplokoki, lahko jih zasledimo tudi posamično ali v krajsih verižicah (Ihan, 2002). Celice v premeru merijo od 0,5 do 1,25  $\mu\text{m}$  in imajo obliko sulice (Tuomanen, 2006, Lydyard in sod., 2009).



Slika 1: Vrstični elektronski posnetek para kokov *S. pneumoniae* (Todar, 2009)

Tako kot vsi streptokoki tudi pnevmonoki nimajo encima katalaze in fermentirajo glukozo do mlečne kisline. Za rast potrebujejo gojišče, obogateno z dodatkom krvi, ki kot vir katalaze nevtralizira nakopičen vodikov peroksid, ki ga proizvajajo bakterije in ki v gojišču brez prisotnega zunanjega vira katalaze zavira bakterijsko rast (Murray in sod., 2002; Tuomanen, 2006). Bakterije *S. pneumoniae* dobro uspevajo na KA, inkubiranem pri temperaturi 37 °C od 24 do 48 ur, in bolje v atmosferi s petimi odstotki ogljikovega dioksida (Lydyard in sod., 2009).

Pnevmonoke večinoma obdaja polisaharidna kapsula in morfologija kolonij je odvisna prav od njene prisotnosti. Kolonije sevov, obdanih s polisaharidno kapsulo, so okrogle oblike, gladke, svetleče, izbočene in v premeru merijo od enega do treh milimetrov (Murray in sod., 2002). Sevi nekaterih serotipov, kot sta na primer 3 in 37, tvorijo velike sluzaste kolonije (Tuomanen, 2006). V pnevmonokni kulturi običajno zrastejo tudi posamezne bakterije, ki ne izdelujejo polisaharidne kapsule in tvorijo manjše, suhe, hrapave kolonije ploščatega videza (Ihan, 2002; Murray in sod., 2002).

Spremembe v morfologiji kolonij pnevmonokov, gojenih in vitro, povezujejo tudi z virulenco. Znanstveniki so pri bakteriji *S. pneumoniae* ugotovili pojav spontane reverzibilne fenotipske variacije ali fazne variacije, ki se kaže v različni morfologiji kolonij. Vsak sev predstavlja raznovrstno skupino organizmov, ki se med seboj razlikujejo v več značilnostih. Imajo lahko prisotnih več kapsularnih polisaharidov in manj tehno-čne kisline (TA), so prilagojeni na preživetje v krvi in v živalskih modelih sepse dokazano bolj virulentni. Take bakterijske celice pnevmonokov tvorijo motne kolonije. V prisotnosti manj kapsularnih polisaharidov in več TA tvorijo prosojne kolonije. Študije na živalskih modelih so pokazale, da take celice bolj učinkovito kolonizirajo nosno-žrelni prostor in niso virulentne. Za izjemno sposobnost prilagoditve bakterije *S. pneumoniae* na raznolika

okolja v človeškem telesu so tako potrebne spremembe v izražanju specifičnih celičnih površinskih molekul. Fazna variacija ustvarja mešane populacije, ki omogočajo selekcijo pnevmokokov in vivo z značilnostmi, ki jim omogočajo bodisi kolonizacijo ali sistemsko okužbo (Weiser in sod., 2000; Tuomanen, 2006).

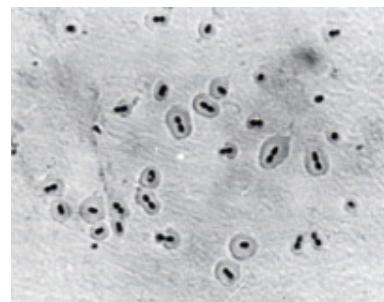


Slika 2: *S. pneumoniae* na krvnem agarju na katerega je položen disk optohina (Todar, 2009)

Na KA v aerobnih pogojih rasti pnevmokoki tvorijo kolonije s pasom nepopolne hemolize alfa. S staranjem kolonije na KA zaradi procesa avtolize postanejo v sredini ugreznjene in imajo značilno obliko figur za igro dama (Lydyard in sod., 2009). V anaerobnih pogojih rasti lahko bakterije tvorijo hemolizo beta, ki jo povzroča za kisik labilen hemolizin. Pnevmoke od ostalih streptokokov ločimo po tem, da so topni v soleh žolčnih kislin in občutljivi za optohin (Tuomanen, 2006).

Polisaharidna kapsula, ki je glavni virulentni dejavnik bakterije *S. pneumoniae*, predstavlja najpomembnejši sestavni del zunanje površine pnevmokokov. Kapsulo gradijo kompleksni polisaharidi, ki delujejo kot antigeni. Glede na razlike v njeni zapleteni kemični zgradbi, torej v sestavi polisaharidov in njihovem medsebojnem povezovanju, so znanstveniki pnevmokoke razvrstili na različne serološke tipe (Lydyard in sod., 2009). Do danes so prepoznali in opisali 46 različnih seroskupin (Henrichsen, 1995), ki so jih dalje razvrstili v 91 različnih serotipov, verjetno pa jih obstaja še več. Park in sod. (2007) so nazadnje odkrili in opisali kot 91. nov kapsularni serotip 6C. Kljub velikemu številu različnih serotipov vsi ne povzročajo bolezni (Isaacman in sod., 2009).

Ena prvih metod, ki se je uporabljala za tipizacijo pnevmokoknih sevov in se uporablja še danes, je t. i. Neufeld-Quellung test. Pnevmokeknim sevom tip polisaharidne kapsule določimo z reakcijo nabrekanja kapsule. Kapljico bakterijske suspenzije zmešamo s kapljico pnevmokoknega antiseruma, ki vsebuje tipsko specifična monoklonska protitelesa, za boljšo vidljivost reakcije pnevmokokov dodamo metilensko modrilo in reakcijo opazujemo pod mikroskopom. Pozitivno reakcijo predstavljajo pnevmokoki z

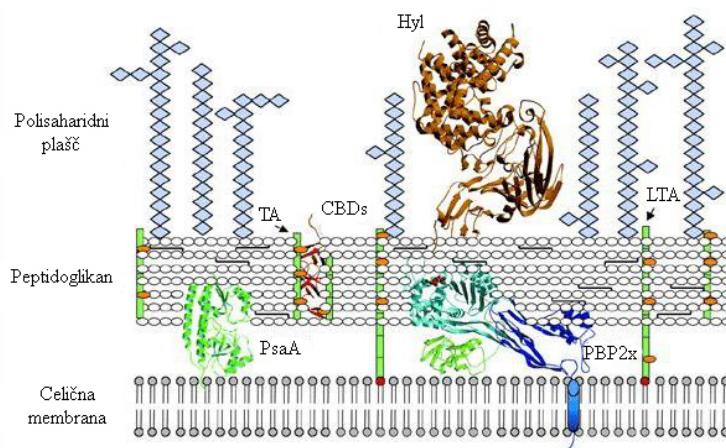


Slika 3: Reakcija nabrekanja kapsule (Todar, 2009)

vidno nabreklo kapsulo v obliki »haloja«. Polisaharidna kapsula po vezavi s tipsko specifičnimi protitelesi seruma namreč nabrekne, ob tem se poveča refrakcijski indeks in kapsula postane bolj vidna (Tuomanen, 2006; Lydyard in sod., 2009).

Pomembna značilnost pnevmokokov je zmožnost preklopa tipa kapsule, do katerega lahko pride zaradi prerazporeditve genov znotraj genoma, mutacij ali pridobitve genov za sintezo drugega kapsularnega tipa s transformacijo. To jim služi kot mehanizem, s katerim se lahko izognejo selekcijskemu pritisku, ki ga povzroča cepljenje s cepivi, ki vsebujejo le omejeno število serotipov, in jim olajša preživetje (Pletz in sod., 2007; Lynch in Zhanel, 2009).

Celična stena pnevmokokov ima značilno zgradbo po Gramu pozitivnih bakterij. Sestavljena je iz šestih slojev peptidoglikana s kovalentno vezano teihoično kislino in v celično membrano zasidrano lipoteihoično kislino. Obe obliki teihoične kisline imata identične strukture ogljikovih hidratov in vsebujeta holin. Na zunanji površini bakterije *S. pneumoniae* se nahajajo beljakovine iz družine holin-vezavnih beljakovin (angl. choline-binding proteins, CBP), ki se nekovalentno vežejo na fosforilholin v teihoični in lipoteihoični kislini. Med njimi so pomembnejše glavni pnevmokokni avtolizin (LytA), hidrolazi (LytB in LytC), ki sodelujeta pri delitvi hčerinske celice kot tudi pri vnosu tujih DNA v bakterijsko celico, pnevmokokna površinska beljakovina A (PspA) in holin-vezavna beljakovina A (CbpA), ki služi kot adhezin (Lydyard in sod., 2009).



Slika 4: Shematični prikaz celične stene pnevmokokov, TA – teihoična kislina, LTA – lipoteihoična kislina, Hyl – hialuronidaza, PsaA – pnevmokokni površinski antigen A, CBDs – vezavno mesto za holin-vezavne beljakovine, PBP – penicilin vezooče beljakovine (Di Guilmi in Dessen, 2002)

### 2.3 GENOM IN SPOSOBNOST KOMPETENCE BAKTERIJE *S. pneumoniae*

Genom bakterije *S. pneumoniae* je krožna molekula DNA, dolga okoli 2 milijona baznih parov (bp). Različni znanstveniki so leta 2001 razkrili prvi celotni nukleotidni zaporedji genomov dveh sevov *S. pneumoniae*, TIGR4 (sev serotipa 4) in R6 (avirulentni sev serotipa 2 brez kapsule) (Hoskins in sod., 2001; Tettelin in sod., 2001). Danes je znanih devet dodatnih celotnih zaporedij genomov *S. pneumoniae*, še več jih je v fazi zaključevanja ali določanja zaporedja (Genome project ..., 2009).

Sjöström (2007) navaja, da dostopnost znanih nukleotidnih zaporedij genomov ni velikega pomena le za molekularne analize, temveč tudi za boljše razumevanje genetskih razlik med različnimi pnevmokoknimi sevi. Razlike, ki jih prikaže v celoti določeno nukleotidno zaporedje pnevmokoknih sevov, lahko deloma pripisemo njihovi sposobnosti prevzema proste DNA iz okolice in njene vgradnje v svoj genom. Imajo torej genetsko zasnovo za razvoj genetske kompetence, so naravno kompetentni. Za regulacijo kompetence uporabljajo sistem »quorum sensing« (Shaaly in sod., 2005; Hsieh in sod., 2006). S horizontalnim prenosom DNA lahko pridobijo gene, ki kodirajo virulentne dejavnike, gene za sintezo kapsule in determinante odpornosti ne glede na njihov izvor (Shaaly in sod., 2005).

Raziskava, ki so jo opravili Hsieh in sod. (2006), je pokazala, da so nekateri serotipi pnevmokokov bolj kompetentni in drugi manj. Kompetenca pnevmokokov za genetsko transformacijo je ključni dejavnik evolucije pnevmokokov predvsem v razvoju virulence in odpornosti proti antibiotikom (Hsieh in sod., 2006). Zmožnost prevzema tuje DNA predstavlja enega izmed glavnih mehanizmov, odgovornih za vedno večji svetovni problem naraščanja in širjenja odpornih pnevmokoknih sevov (Sjöström, 2007). Sposobnost horizontalnega prenosa genov *S. pneumoniae* povzroča genetsko raznolikost pnevmokokov in je pomemben dejavnik, ki pnevmokokom olajša prilagoditev na spremembe in s tem preživetje v okolju (Hsieh in sod., 2006).

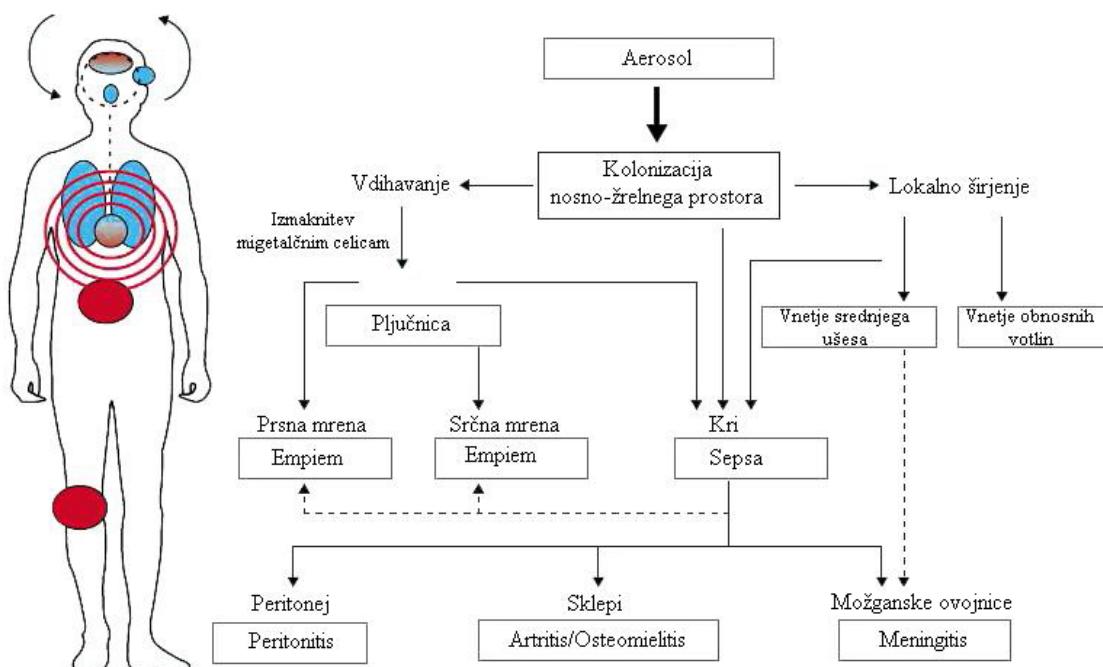
### 2.4 PATOGENEZA BAKTERIJE *S. pneumoniae*

Bakterija *S. pneumoniae* naseljuje nosno-žrelni prostor človeka in praviloma ne povzroči bolezni (Bogaert in sod., 2004). Vendar lahko ob ugodnih razmerah, kot so npr. zmanjšana odpornost ali okvare dihalnega epitela gostitelja, zaradi številnih virulentnih dejavnikov

povzroči različne bolezni, med katerimi so bolj pogoste, a manj nevarne akutno vnetje srednjega ušesa in okužbe zgornjih in spodnjih dihal, kot so akutno vnetje obnosnih votlin, bronhitis in pljučnica, ter manj pogoste, a hujše, invazivne oblike bolezni, kot so pljučnica z bakteriemijo, sepsa in meningitis (Butler, 2004; Isaacman in sod., 2009). Pnevmonokone bolezni opredelimo kot invazivne, kadar *S. pneumoniae* osamimo iz primarno sterilnih mest (npr. krvi, likvorja, aspiratov ali punktatov sterilnih telesnih tekočin) (Lynch in Zhanel, 2009). Redkeje povzroča tudi številne druge lokalne okužbe, ki nastanejo z lokalnim širjenjem ali razsojem preko krvi ali limfe (Butler, 2004). Za pnevmonokne okužbe je značilna mobilizacija vnetnih celic v žarišču okužbe (Murray in sod., 2002). Potek bolezni po okužbi s *S. pneumoniae* pa je odvisen tako od dejavnikov gostitelja kot bakterije (Lynch in Zhanel, 2009).

#### 2.4.1 Kolonizacija in nastanek okužbe

Praviloma je vir okužbe oseba s pnevmonokiki v zgornjih dihalih. Prenos okužbe je kapljični, sledi lokalna invazija, običajno v obliki okužbe brez znakov bolezni z ustvarjanjem protiteles in imunosti (Stantič Pavlinič in Pavlinič, 2008).



Slika 5: Patogeneza pnevmonokne okužbe (Bogaert in sod., 2004)

Pnevmonoki se pritrdijo na epitelij sluznice dihal. Pnevmonokom omogočajo naselitev v nosno-žrelnem prostoru, ki poteka brez znakov bolezni, beljakovine njihove celične stene, kot je površinski adhezin A (PsaA), s pomočjo katerega se vežejo na ogljikove hidrate (N-acetil-glukozamin) na površini celic dihalnega epitelija. Poleg tega beljakovine celične stene pnevmonokov prispevajo k hidrofobnim in elektrostatičnim značilnostim njihove površine in lahko olajšajo pritrditev na celice gostitelja deloma preko nespecifičnih, fizikalno-kemijskih interakcij (Bogaert in sod., 2004).

Človeški organizem lahko omeji in prepreči širjenje pnevmonokov iz nosno-žrelnega prostora v spodnje dihalne poti z vezavo aktivnega dela protiteles IgA na bakterijsko celico in z vezavo Fc dela IgA na mucin. To omogoči ujetje bakterij v sluz, ki jo izloča sluznica dihalnega sistema, in njihovo odstranjevanje iz dihalnih poti z delovanjem migetalčnega epitelija. Pnevmonoki lahko onemogočijo naravnni obrambni mehanizem gostitelja z izločanjem IgA proteaze in pnevmolizina. Pnevmolizin se veže na holesterol v citoplazemski membrani migetalčnih celic in tvori pore. Na ta način celice poškoduje ali povzroči njihovo smrt in s tem uniči zaščitno delovanje migetalčnega epitelija. Izločena IgA proteaza cepi IgA, vezane na površini bakterije, ter tako omogoči migracijo pnevmonokov v spodnji dihalni trakt (Murray in sod., 2002).

Naselitev pnevmonokov v nosno-žrelnem prostoru je začetni korak pri razvoju vseh pnevmonoknih bolezni (Weiser, 2004). Povzročijo lahko lokalne ali sistemske okužbe. Ob ugodnih razmerah se pnevmonoki lahko razširijo v obnosne votline, srednje uho, pljuča in okolna tkiva dihal z možnostjo izčiščevanja ali nadaljnega širjenja v dihalih. Z vdihavanjem preidejo v pljuča, od koder lahko vstopijo v krvni ali limfnii obtok, kjer z razsojem preko krvi ali limfe lahko povzročijo vnetje in poškodbe različnih notranjih organov ali njihovih ovojnic (Murray in sod., 2002; Stantič Pavlinič in Pavlinič, 2008). Mehanizmi, ki pnevmonokom omogočajo prehod iz komenzala, ki naseljuje nosno-žrelni prostor, v virulentnega patogena, ki povzroči bolezen, še niso v celoti pojasnjeni. Vendar je znano, da ima pri naseljevanju in nadalnjih okužbah pnevmonokov pomembno regulatorsko vlogo lokalni imunski odgovor gostitelja (Hammerschmidt in sod., 2007).

Za prehod iz asimptomatskega nosilstva pnevmonokov v nosno-žrelnem prostoru v invazivno bolezen je poleg onemogočanja naravnih obrambnih mehanizmov potrebno lokalno nastajanje vnetnih dejavnikov, kot sta interlevkin-1 in dejavnik tumorske nekroze.

Vnetna kaskada in citokini spremenijo tip in zvišajo raven izražanja receptorjev na tarčnih epitelijskih in endotelijskih celicah ter jih tako aktivirajo. Preko fosforilholina v celični steni se pnevmokoki vežejo na receptor za faktor aktivacije trombocitov (rPAF), izražen na površini endotelijskih celic in tkivnih celic v pljučih, na možganskih ovojnicah in stenah krvnih žil. Poleg tega prehod skozi sluznične pregrade poveča vezava pnevmkokne holin-vezavne beljakovine A (CbpA), ki je najpomembnejši pnevmkokni adhezin za pritrditev na aktivirane celice, in receptorja, ki je odgovoren za transport IgA skozi epitelne celice (pIgR). Pnevmočoki z omenjenimi vezavami lahko vstopijo v celice in si omogočijo prehod skozi dihalni epitelij in žilni endotelij, s čimer pridejo v kri in krvni obtok. Pnevmočokom je na ta način omogočen vdor skozi sluznice v telo in s tem širjenje v druge predele telesa (Bogaert in sod., 2004). Invazivnost pnevmkoknih celic je nizka, saj v gostiteljeve celice endotelija ali epitelija vdre le približno 0,2 % bakterij. Kljub temu sta vdor *S. pneumoniae* v telo in mehanizem, s katerim bakterije vstopijo v centralni živčni sistem, odločilnega pomena za nastanek in razvoj invazivnih pnevmkoknih bolezni (Rodriguez in Orihuela, 2008).

#### **2.4.2 Virulentni dejavniki**

Danes poznamo številne virulentne dejavnike, ki pnevmokokom omogočajo kolonizacijo, širjenje med ljudmi, onemogočanje imunskih mehanizmov, povzročitev okužbe in različnih bolezni. Nekateri so bolj znani in podrobnejše raziskani kot drugi. Poglavitni virulentni dejavnik pnevmkokov je polisaharidna kapsula. Celična stena igra ključno vlogo pri vnetju, ki ga sproži organizem. V zadnjih dvajsetih letih so razjasnili tudi pomembno vlogo različnih beljakovin (Tuomanen in sod., 2004; Kadioglu in sod., 2008).

##### **2.4.2.1 Polisaharidna kapsula**

Pnevmočoke obdaja bogat sloj polisaharidov, t. i. kapsula. Kapsularni polisaharidi predstavljajo raznoliko skupino polimerov, saj se med seboj razlikujejo po sestavi sladkornih sestavin in povezavah med njimi. Kljub tej raznolikosti je vsem kapsularnim polisaharidom skupna poglavita vloga pri virulenci. Kapsula namreč ščiti pred fagocitozo in tako olajšuje vdor v kri. Preprečuje opsonizacijo celic s sestavinami komplementnega sistema in interakcije vezanih sestavin komplementnega sistema s fagocitnimi receptorji

(Yother, 2004). Raziskave, ki sta jih opravilia Watson in Musher (1990), so pokazale, da so inkapsulirani sevi vsaj  $10^5$ -krat bolj virulentni kot izogene mutante sevov brez kapsule.

Morona in sod. (2006) so preučevali mutacije, ki vplivajo na povezavo polisaharida na celično steno. Ugotovili so, da mutante niso zmožne vstopiti v krvni obtok zaradi izgube reguliranja produkcije polisaharida in njegove zmanjšane pritrjenosti na celično steno. To kaže na to, da mora biti kapsularni polisaharid pritrjen na celično steno pnevmokokov, da ti lahko povzročijo invazivna obolenja. Za preživetje pnevmokokov v različnih okoljih gostitelja je prav tako pomembna sposobnost uravnavanja količine proizvedenega kapsularnega polisaharida. Maksimalno izražanje kapsularnih polisaharidov je pomembno za izognitev s komplementom povezane fagocitoze med sistemskimi okužbami. Pred pojavom invazivnega obolenja pnevmokoki naseljujejo nosno-žrelni prostor, kjer je potrebno nižje izražanje kapsularnih polisaharidov, da se lahko izpostavijo adhezini, ki so potrebeni za kolonizacijo (Morona in sod., 2006).

Danes poznamo 91 serotipov kapsul (Park in sod., 2007), vendar so zmožnosti povzročitve invazivnega obolenja ali kolonizacije med njimi različne. Zato se razširjenost in prevalenca serotipov bistveno razlikujeta med sevi asimptomatskih nosilcev v primerjavi z sevi bolnikov z invazivnimi pnevmokoknimi boleznimi. Kljub velikemu številu različnih serotipov jih le manjše število povzroča invazivne okužbe (Vestrheim in sod., 2008).

Prevladujoči serotipi se razlikujejo glede na starostne skupine in geografsko območje. Pri odraslih prevladujejo tipi 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F in 23F. Med njimi se pogosteje pojavljajo tipi 3, 7F, 9V, 14 in 23F. Pri otrocih invazivna obolenja najpogosteje povzročajo tipi 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F in 23F. Sevi tipa 3 pri otrocih pogosto povzročijo vnetje srednjega ušesa, vendar le redko invazivno okužbo (Yother, 2004).

Izid bolezni vendarle ni odvisen le od kapsularnega tipa. Različne študije so pokazale, da so za povzročitev invazivne bolezni poleg kapsularnega tipa predvsem pomembne lastnosti klona določenega serotipa (Mizrachi Nebenzahl in sod., 2004; Sandgren in sod., 2005).

#### 2.4.2.2 Celična stena

Med citoplazemsko membrano in polisaharidno kapsulo pnevmokokov leži celična stena, ki je sestavljena iz peptidoglikana, teihoične kisline (TA) in lipoteihoične kisline (LTA) (Hammerschmidt in sod., 2007). Sestavine celične stene se vežejo na humane CD14 in Tollu-podobne receptorje (angl. Toll-like receptors, TLR), čemur sledi kaskada vnetnih odzivov gostitelja in sproščanje mediatorjev vnetja, kot so interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 in dejavnik tumorske nekroze TNF- $\alpha$ . Neposredno lahko aktivirajo koagulacijsko kaskado in komplement po alternativni poti in s tem povzročijo kemotakso levkocitov (Tuomanen, 2006).

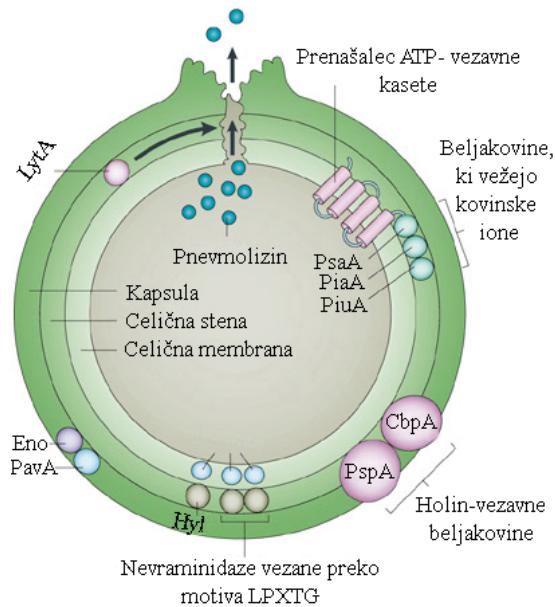
Teihoična in lipoteihoična kislina vsebuje fosforilholin, ki ima vlogo adhezina in služi kot vezavno mesto holin-vezavnim beljakovinam. Preko fosforilholina se pnevmokoki vežejo na receptor za faktor aktivacije trombocitov (rPAF) na epitelijskih celicah. Med vnetnim odgovorom se njegova raven izražanja zviša in omogoči pnevmokokom vdor skozi sluznice v telo (Mitchell, 2006; Tuomanen, 2006).

#### 2.4.2.3 Beljakovine in drugi virulentni dejavniki

Številne študije so pokazale, da je pneumolizin močan virulentni dejavnik. Prisoten je v praktično vseh pnevmokoknih sevih in ima dobro ohranjeno aminokislinsko zaporedje (Kadioglu in sod., 2008). Je znotrajcelični toksin, ki se ob razgradnji bakterijske celice iz nje sprosti kot topen monomer (Mitchell, 2004). Pri večjih koncentracijah (več kot 50 monomernih enot) se veže na molekule holesterola na površini membran epitelnih ali fagocitnih celic, kjer oligomerizira in tvori velike transmembranske pore. Pri tem prekine normalno fiziologijo tarčnih celic, kar vodi v njihovo smrt in poškodbe tkiva (Kadioglu in sod., 2008). Pri manjših koncentracijah lahko aktivira komplement po klasični poti v odsotnosti specifičnih protiteles (Mitchell, 2004), zavira gibanje migetalk na respiratornem epiteliju in ependimu možganskih ventriklov, zavira oksidativni izbruh nevtrofilsnih granulocitov in njihovo kemotakso, zavira rast in razmnoževanje limfocitov ter spodbudi proizvajanje citokinov (Tuomanen, 2006; Kadioglu in sod., 2008).

Je eden izmed nujnih virulentnih dejavnikov bakterije pri razvoju pljučnice, bakteriemije in meningitisa (Hirst in sod., 2004). Na mišjem modelu preučevanja akutne pljučnice so Kadioglu in sod. (2008) dokazali, da je pneumolizin bistven za preživetje pnevmokokov v

zgornjem in spodnjem delu respiratornega trakta. Potreben je tudi za razširjanje bakterij iz pljuč v krvni obtok. Velik pomen ima pri okvari sluha in poškodbah možganov pri meningitisu.



Slika 6: Virulentni dejavniki pnevmkokov, Hyl – hialuronidaza, LytA - pnevmkokni avtolizin, Eno – enolaza, PavA – faktor adhezije in virulence A (Kadioglu in sod., 2008)

Poleg pnevmolizina virulenco pnevmkokov povzročajo tudi številne druge beljakovine celične stene, ki jih glede na analize genoma lahko razdelimo v tri skupine: holin-vezavne beljakovine, lipoproteini in beljakovine, ki so v celično steno usidrane preko ohranjenega pentapeptidnega motiva LPXTG (X predstavlja katerokoli aminokislino) (Kadioglu in sod., 2008).

Barocchi in sod. (2006) so pri nekaterih sevih odkrili pilusom podobne strukture. Raziskave, opravljene na mišjih modelih, so pokazale, da bi pilusi lahko predstavljali pomemben virulentni dejavnik, saj olajšujejo pritrditev na celice in izzovejo vnetni odgovor gostitelja. Vendar rezultati raziskave, ki so jo opravili Basset in sod. (2007), kažejo na to, da kljub podatkom, pridobljenih iz mišjih študij, pilusi verjetno ne predstavljajo pomembnega dejavnika virulence za nastanek invazivnih bolezni pri ljudeh.

K virulenci pnevmkokov prispeva tudi tvorba vodikovega peroksidu, saj lahko intermediati reaktivnega kisika povzročijo poškodbe tkiv (Murray in sod., 2002). Pri meningitisu lahko povzročijo apoptozo živčnih celic. Pnevmlizin in vodikov peroksid ne

povzročita samo propada celic, temveč tudi močno vzbudita produkcijo dušikovega oksida, ki je eden izmed pomembnih dejavnikov pri nastanku septičnega šoka (Tuomanen, 2006).

## 2.5 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OKUŽBO Z BAKTERIJO *S. pneumoniae*

Na podlagi epidemioloških raziskav so ugotovili številne različne dejavnike tveganja za razvoj pnevmokoknih bolezni. Starost je glavni dejavnik tveganja za pnevmokokne okužbe. Čeprav se lahko pojavijo pri vseh starostih, so najbolj ogrožene starostne skupine dojenčki in otroci, mlajši od pet let, ter starejši ljudje po 65. letu (Cartwright, 2002). Pojavnost invazivnih pnevmokoknih okužb je najvišja pri otrocih do dveh let starosti, po petem letu pojavnost nenadoma močno upade in poraste ponovno okoli 60. leta (Paragi in Kraigher, 2009). Dojenčki in mlajši otroci so najbolj dovzetni za pnevmokokne bolezni med tretjim in 24. mesecem starosti, ker začnejo materina protitelesa iz krvi počasi izginjati, njihov imunski sistem pa še ni dozorel (Bechini in sod., 2009). Raziskava, ki so jo opravili Levine in sod. (1999), je pokazala, da so invazivnim pnevmokoknim boleznim bolj izpostavljeni otroci, ki obiskujejo vrtec. Poleg tega tveganje za invazivne pnevmokokne bolezni pri otrocih povečajo pomanjkanje dojenja, predčasni porod in nizka porodna teža (Levine in sod., 1999; Shinefield in sod. 2002). Večja nagnjenost k pnevmokoknim boleznim zlasti pri starejših ljudeh in pri otrocih, ki obiskujejo vrtec, je povezana z oslabljenim imunskim sistemom, ki je mnogokrat premalo učinkovit zaradi nizke zaščitne ravni protiteles proti polisaharidnim kapsularnim antigenom (Murray in sod., 2002).

Tveganje in resnost pnevmokokne okužbe sta povečana pri okuženih z virusom HIV in ostalih bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom ali obstoječimi kroničnimi boleznimi in stanji, kot so slatkorna bolezen, obstruktivna pljučna bolezen, jetrna ciroza, astma in kronična ledvična bolezen ali odpoved. Pomemben dejavnik tveganja so tudi predhodne respiratorne okužbe (Butler, 2004).

Drugi dejavniki tveganja za pnevmokokne okužbe so alkoholizem, kajenje, izpostavljenost cigaretнемu dimu, pri starejših tudi stik z otroki, podhranjenost, prenaseljenost in slabše družbeno-ekonomske razmere. Večjemu tveganju za pnevmokokne okužbe so izpostavljene tudi nekatere rasne in etnične skupine (Butler, 2004). Bogaert in sod. (2004) v svoji študiji med takimi skupinami omenjajo črnce, Indijance in prvočne prebivalce

Aljaske. Raziskava, ki so jo Giele in sod. (2007) opravili v Avstraliji, je pokazala, da je pojavnost pnevmokoknih invazivnih bolezni precej višja pri otrocih Aboriginov kot pri ostalih otrocih.

## 2.6 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB Z BAKTERIJO *S. pneumoniae*

Okužbe z bakterijo *S. pneumoniae* so pomembni povzročitelji obolenosti in umrljivosti po vsem svetu. Svetovna zdravstvena organizacija je leta 2005 ocenila, da zaradi pnevmokoknih okužb v svetu letno umre približno 1,6 milijona ljudi, od tega 0,7-1 milijon otrok, mlajših od pet let. Velika večina žrtev pnevmokoknih okužb prihaja iz najrevnejših držav sveta (WHO, 2007). Pnevmonokne bolezni so večji vzrok smrti kot katerekoli druge bakterijske bolezni, ki jih lahko preprečimo s cepljenjem (Tuomanen, 2006).

Med boleznimi, ki jih povzročajo okužbe z bakterijo *S. pneumoniae*, je pljučnica najpogostejši vzrok smrti na svetu. Ocenjujejo, da stopnja umrljivosti zaradi pnevmokokne pljučnice znaša 10-20 % in lahko preseže 50 % pri visoko rizičnih skupinah, kot so mlajši otroci in starejši (Cartwright, 2002). Čeprav je pnevmokokni meningitis precej manj pogost, stopnja umrljivosti znaša 20 % v bolj razvitih in 50 % v manj razvitih državah, kar je več kot pri kateremkoli drugem patogenu, ki povzroča meningitis. Poleg tega, odvisno od starosti, 30-60 % preživelih utrpi trajne nevrološke posledice, kot je npr. gluhost (Bogaert in sod., 2004; Tuomanen, 2006). Pnevmonoki povzročijo dve tretjini vseh bakterijskih pljučnic (Mueller-Premru in sod., 2008) in več kot eno tretjino akutnih bakterijskih vnetij obnosnih votlin (Jacobs, 2004). Praktično vsak otrok vsaj enkrat preboli vnetje srednjega ušesa, preden dopolni starost 5 let, nekateri tudi bolj pogosto. Med najbolj pogostimi povzročitelji tega vnetja je prav pnevmokok (Tuomanen, 2006).

Pnevmonoki so del normalne mikrobne flore nosno-žrelne sluznice pri približno 20-60 % zdravih otrok in 5-10 % zdravih odraslih (Bechini in sod., 2009). Iz nosno-žrelnega prostora koloniziranih ljudi se lahko prenesejo na druge ljudi in pri bolj dovezetnih za okužbe povzročijo bolezen. Za pnevmokoke je značilen kapljični prenos preko kašljanja, kihanja in govorjenja, izločkov zgornjih dihal in sline. Do okužbe pride v stiku z bolniki, pogosteje pa z ljudmi, ki so kolonizirani. Zboli le manjši delež okuženih (Butler, 2004). Za širjenje *S. pneumoniae* so pomembnejši zdravi prenašalci kot bolniki (Ihan, 2002).

Kapljični prenos je omogočen zlasti v prenatrpanih okoljih, zaprtih skupnostih (Paragi in sod., 2008) in ustanovah, kot so zavetišča, domovi za ostarele, vrtci, šole, bolnišnični oddelki, vojaške enote in zapori. Kljub temu je večina okužb sporadičnih in so primeri epidemij redki. Občasno poročajo o izbruhih pljučnice, meningitisa in konjunktivitisa, ki jih je povzročil en sam sev (Butler, 2004).

Ko se posamezni sev bakterije naseli v nosno-žrelni sluznici, lahko tam ostane tedne ali meseca in ne povzroči znakov bolezni (Kadioglu in sod., 2008). Huo in sod. (2004) v svoji študiji navajajo, da večina pnevmokoknih okužb ni posledica daljšega vztrajanja bakterije, temveč nedavno pridobljenega serotipa, kar kaže na to, da je za nastanek pnevmokokne bolezni poleg invazivnosti specifičnega pnevmokoknega seva zelo pomembna tudi zmanjšana gostiteljeva odpornost.

Kolonizacija je predhodni korak pnevmokoknih bolezni in kolonizirane osebe predstavlja rezervoar horizontalnega širjenja pnevmokokov v populaciji (Vestrheim in sod., 2008). Ker je kolonizacija najpogostejsa v zgodnjem otroštvu (Kadioglu in sod., 2008), otroci kot rizična skupina predstavljajo najpomembnejši vektor horizontalnega prenosa in širjenja pnevmokoknih sevov v populaciji (Bogaert in sod., 2004). Razširjenost bakterije *S. pneumoniae* v nosno-žrelni sluznici je višja pri odraslih, ki živijo z majhnimi otroki (Jacobs, 2004). Otroci pogosto pridobijo enega ali več sevov zaporedno ali sočasno (Kadioglu in sod., 2008). Večina serotipov naseljuje nosno-žrelni prostor od enega meseca do enega leta, nato jih nadomesti drug serotip (Jacobs, 2004). Prav tako je dobro znano, da lahko nosno-žrelno sluznico sočasno naseljuje več serotipov, vendar običajno le eden med njimi prevladuje (O'Brien in sod., 2008). Del strategije za preprečevanje pnevmokoknih bolezni se osredotoča predvsem na preprečevanje kolonizacije, posebno pri otrocih (Bogaert in sod., 2004).

Pnevmokokne okužbe se lahko pojavijo kadarkoli med letom, vendar je kolonizacija in z njo povezana pojavnost pnevmokoknih bolezni najvišja v zimskih mesecih, ko je prenos bakterije *S. pneumoniae* med ljudmi pogostejši in so pogostejše tudi virusne respiratorne okužbe, ki pnevmokokom olajšajo onemogočanje imunskega sistema in pritrdirjevanje na epitelne celice (Bogaert in sod. 2004, Butler, 2004).

Do danes so odkrili in opisali 91 serotipov bakterije *S. pneumoniae* (Park in sod., 2007), vendar večino okužb povzroča manjše število serotipov. Število serotipov, ki povzročajo invazivne okužbe je še nižje in običajno gre tudi za druge serotipe. Bechini in sod. (2009) v svoji študiji omenjajo, da so raziskave, opravljene v ZDA pred uvedbo cepljenja s 7-valentnim pnevmokoknim konjugiranim cepivom, pokazale, da je približno 80 % invazivnih pnevmokoknih bolezni pri otrocih povzročilo sedem serotipov (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F in 23F).

Pogostost pojavljanja invazivnih pnevmokoknih bolezni in razširjenost serotipov je po svetu različna, odvisna od geografskega območja in socialno ekonomskega statusa. Poleg tega se spreminja skozi čas, saj nanjo vpliva seleksijski pritisk rabe antibiotikov in cepljenja ter razširjanje klonov (Lynch in Zhanel, 2009). Poznavanje razširjenosti serotipov, ki povzročajo invazivna obolenja, je bistveno za oceno možnega vpliva cepiv, ki vsebujejo omejeno število serotipov (Isaacman in sod., 2009).

### **2.6.1 Epidemiologija in spremljanje pnevmokoknih invazivnih okužb v Sloveniji**

Paragi in sod. (2008) so ugotovili, da so v Sloveniji pnevmokoki in meningokoki po uvedbi rednega cepljenja proti bakteriji *Haemophilus influenzae* tipa b (Hib) konec leta 1999 ostali glavni povzročitelji invazivnih bakterijskih okužb. Zlasti v letih po uvedbi cepljenja proti Hib je delež pnevmokoknih okužb pri otrocih narastel. V Sloveniji je pnevmokok najpomembnejši povzročitelj bakterijskih invazivnih okužb pri otrocih po uvedbi cepljenja proti Hib in napogostejši povzročitelj pri odraslih (Paragi in sod., 2003). Spremljanje pojavnosti pnevmokoknih okužb od začetka izvajanja projekta kaže smer njihovega naraščanja (Paragi in sod., 2008).

Incidenca invazivnih pnevmokoknih okužb pri otrocih, mlajših od pet let, znaša v Sloveniji približno 11/100.000, kar je v skladu z evropskimi podatki. V ZDA je incidenca invazivnih pnevmokoknih okužb pri otrocih tri do osemkrat višja (Paragi in sod., 2003). V obdobju od leta 2004 do 2008 so bili pri otrocih v Sloveniji napogosteje izolirani serotipi invazivnih pnevmokokov 14, 1, 6B, 18C, 23F, 4 in 9V ter pri odraslih 3, 14, 1, 4, 9V, 23F in 7F (Paragi in Kraigher, 2009).

## 2.7 ODPORNOST BAKTERIJE *S. pneumoniae* PROTI ANTIBIOTIKOM

V 40. letih dvajsetega stoletja se je penicilin začel množično uporabljati, s čimer se je začela t. i. doba antibiotikov. Pnevmoniki so veljali kot popolnoma občutljivi za penicilin do sredine 60. let (Dagan in Klugman, 2008). Takrat se je namreč pojavil prvi klinični sev z zmanjšano občutljivostjo za penicilin in leta 1967 so v Avstraliji opisali prvi sev, ki je vmesno odporen proti penicilinu (Hansman in Bullen, 1967; Klugman, 1990). Penicilin je od svojega odkritja ostal zdravilo prvega izbora za zdravljenje pnevmokoknih okužb, ko se je pojavljala odpornost proti tetraciklinom, kloramfenikolu, makrolidom in trimetoprimu s sulfametoksazolom. Leta 1977 so se v Afriki pojavili pnevmkokni sevi, ki niso bili odporni le proti vsem tem skupinam antibiotikov, temveč tudi proti penicilinu, in od 80. let dvajsetega stoletja razširjenost proti penicilinu odpornih pnevmokokov po vsem svetu nenehno narašča (Dagan in Klugman, 2008).

Pojav pnevmokokov, odpornih proti penicilinu in drugim betalaktamskim antibiotikom, v 80. in 90. letih dvajsetega stoletja je privadel do povečane rabe makrolidov, fluorokinolonov in drugih ne-betalaktamskih antibiotikov pri zdravljenju pnevmokoknih okužb. Čeprav je raba teh antibiotikov omogočila učinkovito alternativno zdravljenje, se je vzporedno z njihovo večjo uporabo zaradi nastalih selektivnih pritiskov povečala tudi razširjenost proti tem antibiotikom odpornih sevov (Ambrose in Stephens, 2004).

V 80. letih so večkratno odporne seve pnevmokokov odkrili v Španiji, od koder naj bi se razširili po vsem svetu (Dagan in Klugman, 2008). Pojav proti penicilinu odpornih in večkratno odpornih sevov pnevmokokov je v 90. letih postal velik svetovni javnozdravstveni problem in ostaja še danes (McGee in sod., 2001).

V evropskih državah so deleži odpornih sevov pnevmokokov različni. Povezani so z različno porabo antibiotikov. O višjem deležu proti penicilinu odpornih sevov poročajo iz Francije, Španije in držav vzhodne Evrope v primerjavi z Nemčijo, Nizozemsko in severno Evropo, kjer je odpornost pnevmokokov proti antibiotikom nižja (Riedel in sod., 2007; Isaacman in sod., 2009). Profil odpornosti *S. pneumoniae* ima dinamičen značaj. Odpornost proti penicilinu je v nekaterih evropskih državah stabilna, medtem ko v drugih narašča ali rahlo upada (EARSS ... , 2008). Stopnja odpornosti pnevmokokov proti

penicilinu pa je precej višja v nekaterih predelih Latinske Amerike (do 60 %) in v nekaterih azijskih državah (do 80 %) (Appelbaum, 2002).

Preglednica 1: Odpornost invazivnih sevov *S. pneumoniae* v Sloveniji v letih 2002 – 2006 (Paragi in sod., 2007)

Leto	Št. inv. sevov	Delež vmesno odpornih in odpornih invazivnih sevov v %					
		PEN	CTK (men.)	CTK (nemen.)	ERI	TET	TMP-SMZ
2002	92	16,3	2,2	0	14,2	14,1	23,9
2003	150	17,3	2,7	0	7,3	6,7	18,0
2004	171	<b>27,5</b>	11,7	5,3	11,7	7,0	27,0
2005	211	12,8	6,2	2,8	12,3	6,2	12,3
2006	155	20,6	5,8	3,9	13,5	7,7	18,8

PEN – penicillin, CTK – ceftriakson, ERI – eritromicin, TET - tetraciklin, TMP-SMZ – trimetoprim s sulfametoksazolom, men. – meningitični, nemen. – nemeningitični primeri pnevmokoknih bolezni

Iz Preglednice 1 je razvidno, da smo v Sloveniji v letu 2004 opazili porast odpornosti proti penicilinu in nekaterim drugim antibiotikom. Delež proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih sevov je v letu 2004 znašal kar 27,5 % (Paragi in sod., 2007). Slovenija je bila tako v Evropi v letu 2004 ena izmed držav z najvišjim deležem proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih pnevmokoknih sevov, saj so o najvišjih deležih poročali iz Izraela (37 %), Španije (29 %), Portugalske (27 %) in Slovaške (29 %) ter o najnižjih iz Nemčije (1,4 %), Nizozemske (1,7 %) in Norveške (1,5 %) (EARSS ..., 2005). V letu 2005 je v Sloveniji sledil padec odpornosti celo pod raven iz leta 2002, ko je delež proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih sevov znašal 12,8 %. V letih 2003, 2006, 2007 in 2008 se je gibal med 17 in 21 % (Paragi in sod., 2007; Paragi in Kraigher, 2009). Pri otrocih so bili deleži odpornih sevov v povprečju skoraj dvakrat večji kot pri odraslih (Paragi in sod., 2008). V letih 2004 do 2007 so proti penicilinu vmesno odporni in odporni sevi najpogosteje pripadali serotipom 14, 9V, 6B, 19F in 23F (Paragi in sod., 2008).

### 2.7.1 Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom

Bakterije lahko pridobijo odpornost proti antibiotikom zaradi spontanih mutacij bakterijske lastne DNA ali s horizontalnim genskim prenosom, torej s pridobitvijo tujega genskega materiala s plazmidi ali mobilnimi genetskimi elementi, kot so transpozoni in bakteriofagi (Pletz in sod., 2007).

Pri proučevanju bakterije *S. pneumoniae* so odkrili večino znanih mehanizmov odpornosti bakterij proti antibiotikom (Dagan in Klugman, 2008). Odpornost pnevmokokov proti betalaktamskim antibiotikom temelji na kompleksnem zaporedju več mutacij, ki vodijo v strukturne spremembe nekaterih penicilin vezičnih beljakovin, PBP (angl. penicillin-binding proteins). Mutacije, ki nastanejo na kromosому bakterije in zmanjšajo tarčnim mestom antibiotikov afiniteto za njihovo vezavo, so najpogosteji vzrok odpornosti tudi drugih ne-betalaktamskih antibiotikov, vključno s kinoloni, trimetoprimom in rifampinom. Horizontalno širjenje odpornosti proti tem antibiotikom v različne seve pnevmokokov je posledica genetske transformacije. Zapisi za determinante odpornosti proti makrolidom, tetraciklinu in kloramfenikolu pa se nahajajo na konjugativnih transpozonih, ki posredujejo njihovo širjenje v druge seve. Preko plazmidov posredovana odpornost je pri *S. pneumoniae* zelo redek pojav (Bergmann in sod., 2004; Ambrose in Stephens, 2004).

Velik del pridobivanja odpornosti poteka v nosno-žrelnem prostoru, ki ga pnevmokoki naseljujejo dalj časa in v njem lahko izmenjujejo DNA z drugimi pnevmokoknimi sevi kot tudi z drugimi vrstami bakterij. Streptokoki skupine viridans so pogosto donorji prenosa genetskih determinant odpornosti v bakterijo *S. pneumoniae* (Pletz in sod., 2007).

Mehanizmi odpornosti pnevmokokov proti antibiotikom so zbrani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Mehanizmi odpornosti *S. pneumoniae* proti antibiotikom (Charpentier in Tuomanen, 2000; Ambrose in Stephens, 2004; Montagnani in sod., 2007; Pletz in sod., 2007)

Skupina antibiotikov	Antibiotik	Mehanizem odpornosti
Penicilini	Penicilin	spremembe v strukturi PBP (1a, 2x, 2b)
Cefalosporini	Cefotaksim	spremembe v strukturi PBP (1a, 2x)
	Ceftriakson	
Karbapenemi	Imipenem	spremembe v strukturi PBP
Fluorokinoloni	Ciprofloksacin	mutacije v genih za girazo ali topoizomerazo IV aktivno črpanje iz celice
Makrolidi	Eritromicin	metilacija 23S rRNA mutacije v genih za komponente ribosoma (23S rRNA, L4, L22) aktivno črpanje iz celice
Linkozamidi	Klindamicin	metilacija 23S rRNA
		mutacije v genih za komponente ribosoma (23S rRNA, L4, L22)
Kloramfenikol	Kloramfenikol	encimska inaktivacija
Tetraciklini	Tetraciklin	zaščita ribosomov s produkti genov <i>tet</i> (M) in <i>tet</i> (O)
Trimetoprim	Trimetoprim	mutacija v genu za DHFR
Sulfonamidi	Sulfametoksazol	mutacije v genu za DHPS

PBP – penicilin vezocene beljakovine, DHFR – dihidrofolat reduktaza, DHPS – dihidropteroat sintaza

O odpornosti pnevmokokov proti vankomicinu do danes še niso poročali. Vendar so v različnih delih sveta že odkrili proti vankomicinu vmesno odporne seve, kar je zaskrbljujoče, saj ti lahko hitro razvijejo odpornost (Charpentier in Tuomanen, 2000; Jacobs, 2004).

### 2.7.1.1 Mehanizem odpornosti proti penicilinu

Molekularni mehanizmi odpornosti pnevmokokov proti penicilinu in drugim betalaktamskim antibiotikom ne temeljijo na izločanju encima beta laktamaze, temveč so povezani s spremembami strukture in funkcije penicilin vezocih beljakovin, PBP (angl. penicillin-binding proteins) (Klugman, 1990; Charpentier in Tuomanen, 2000). PBP so encimi v celični steni, nujni za sintezo peptidoglikana, osnovne sestavine bakterijske celične stene. Betalaktamski antibiotiki se kovalentno vežejo na PBP, zavirajo njihovo delovanje in s tem preprečijo sintezo peptidoglikana med celično rastjo in delitvijo. Hkrati

z vezavo nanje aktivirajo membranske avtolitične encime, ki povzročijo razgradnjo peptidoglikana in posledično razgradnjo bakterije (Seme, 2002).

Kompleksno zaporedje sprememb v strukturi PBP je mnogim bakterijam omogočilo razvoj odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom, saj zmanjša afiniteto PBP za njihovo vezavo. Pnevkokoki vsebujejo v celični steni šest različnih PBP (1a, 1b, 2x, 2a, 2b in 3). Osnovni vzrok odpornosti posameznih sevov pnevmokokov proti penicilinu je nastanek mozaičnih genov, ki kodirajo spremembo treh PBP (2b, 2x in 1a) (Reinert, 2009). Mozaični geni so sestavljeni iz odsekov, katerih nukleotidno zaporedje je zelo podobno ali celo enako ustreznim genom, ki kodirajo normalnoafinitetne PBP, in iz odsekov, katerih nukleotidno zaporedje se močno razlikuje od ustreznih odsekov za normalnoafinitetne PBP (Seme, 2002). Najverjetnejše nastanejo s prenosom genov, s homologno rekombinacijo s transformirano DNA znotraj vrste ali med sorodnimi bakterijskimi vrstami, kot sta predvsem *Streptococcus mitis* in *Streptococcus oralis*. Določeni odseki DNA odpornih sevov se lahko od občutljivih sevov razlikujejo za približno 20 %. Ključne spremembe, ki povzročijo odpornost, nastanejo v genih, ki kodirajo domeno za vezavo penicilina, ki je skupna vsem PBP in ima vlogo pri transpeptidaciji med dvema muropeptidoma (Reinert, 2009).

Mozaični geni in posledično spremembe v strukturi PBP se razvijejo po korakih in povzročajo različne stopnje zmanjšane občutljivosti pnevmokokov za penicilin. Spremembe v PBP2x ali PBP2b vodijo v nizko afiniteto vezave penicilina in razvoj proti penicilinu vmesno odpornih sevov. Spremembe v PBP2x in/ali PBP2b so nujne za razvoj odpornosti in so v kombinaciji s spremenjeno PBP1a z nizko afiniteto vezave penicilina vzrok za nastanek proti penicilinu odpornih sevov (Charpentier in Tuomanen, 2000).

### **2.7.2 Pojav in širjenje odpornosti pnevmokokov proti antibiotikom**

V zadnjih dvajsetih letih številne raziskave dokazujejo povezano uporabe antibiotikov z razvojem bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom hkrati. Razmere v okolju, ki spodbujajo bakterijsko sposobnost razvoja in širjenja odpornosti proti antibiotikom, ustvarjajo seleksijski pritisk. Tako široka uporaba antibiotikov poveča seleksijski pritisk in povzroči pojav odpornih bakterij (Tenover, 2001). Ugotovitve raziskave, ki so jo opravili Riedel in sod. (2007), potrjujejo povezano

intenzivnejše porabe betalaktamskih antibiotikov z višjo stopnjo odpornosti pnevmokokov proti penicilinu in večkratno odpornostjo pnevmokoknih sevov.

Antibiotična izpostavljenost je najbolj pomemben dejavnik tveganja za pojav proti antibiotikom odpornih pnevmokokov. Selekcija odpornosti se je pojavila predvsem pri sevih, ki kolonizirajo ali okužijo otroke. Pnevmoniki so del normalne mikrobne flore nosno-žrelne sluznice namreč pogosteje in dalj časa pri otrocih kot pri odraslih. Otroci so tudi pogosteje izpostavljeni različnim protimikrobnim zdravilom in tovrstna izpostavljenost pnevmokokov antibiotikom povzroči izginotje občutljivih sevov bakterije in daje večjo možnost za nosilstvo in širjenje odpornih sevov. Edini razred antibiotikov, proti katerim se odpornost razvije pri odraslih, so fluorokinoloni, ki se skoraj izključno uporabljajo za zdravljenje odraslih bolnikov (Jacobs, 2004; Dagan in Klugman, 2008).

Klinično pomembna odpornost pnevmokokov proti penicilinu, makrolidom in več antibiotikom hkrati je v glavnem povezana s sedmimi serotipi, ki pogosteje naseljujejo nosno-žrelni prostor otrok: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F in 23F. Znano je, da je za globalno pandemijo odpornosti med temi sedmimi serotipi odgovorno manjše število klonov. Otroci igrajo glavno vlogo pri prenosu in širjenju proti antibiotikom odpornih sevov pnevmokokov znotraj skupnosti. Rezultati različnih raziskav kot tveganje za nastanek odpornosti in nosilstvo odpornih sevov navajajo obiskovanje vrtca ali druge oblike kolektivnega varstva, trenutne okužbe dihal in nedavno uporabo antibiotikov (Dagan in Klugman, 2008). Ugotovili so tudi, da skupine bolnikov, ki so v večji nevarnosti za razvoj okužb z odpornimi sevi pnevmokokov, vključujejo bolnike z rakavimi obolenji, okužbo z virusom HIV in boleznijo srpastih celic (Jacobs, 2004).

Pnevmoniki sevi, odporni proti penicilinu, so pogosteje odporni tudi proti drugim antibiotikom (Cartwright, 2002). O večkratno odpornih sevih pnevmokokov govorimo, kadar so odporni proti trem ali več različnim razredom antibiotikov hkrati. Običajno so odporni proti penicilinu, tetraciklinu, eritromicinu, klindamicinu, trimetoprimu s sulfametoksazolom in kloramfenikolu. Vzroki za nastanek večkratne odpornosti pri pnevmokokih še niso popolnoma pojasnjeni, vendar bi za to lahko bili odgovorni transpozoni, na katerih se lahko hkrati nahaja več zapisov za različne determinante odpornosti (Appelbaum, 2002).

Tenover (2001) navaja, da pojav in širjenje večkratno odpornih mikroorganizmov predstavlja konvergenco delovanja več različnih dejavnikov, ki vključujejo mutacije v genih, odgovornih za odpornost, ki lahko razširijo spekter odpornosti, izmenjava genetskih informacij med mikroorganizmi, razvoj selektivnih pritiskov v bolnišnicah in skupnostih, ki olajšajo razvoj in širjenje odpornih organizmov ter širjenje večkratno odpornih klonov bakterij.

### 2.7.3 Koncept klonov

Povečan pojav odpornosti pnevmokokov proti antibiotikom na več geografskih območjih sveta ni omejen s pojavljanjem določenih serotipov, temveč je domnevno posledica širjenja omejenega števila proti antibiotikom odpornih klonov (Sjöström in sod., 2007). Zdi se, da je visoka stopnja klonalnosti značilna za proti penicilinu vmesno odporne in odporne seve pnevmokokov in je vsaj delno povezana z zahtevnostjo mehanizma pridobivanja determinant odpornosti proti penicilinu, kar je tudi vzrok za njihovo relativno redko pridobitev. Nastali kloni proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih pnevmokokov, ki pridobijo selektivno prednost, se kasneje razširijo v bakterijskih populacijah in se postopno spreminjajo skozi mutacije in z rekombinirano DNA drugih pnevmokokov (Sadowy in sod., 2007).

Molekularne študije so pokazale, da so proti penicilinu odporne in večkratno odporne populacije pnevmokokov zelo dinamične in da je pojavljanje odpornosti kombinacija širjenja odpornih klonov, pridobitve in izgube genov odpornosti v teh klonskih linijah in širitev genov odpornosti v nove klomske linije, navajajo McGee in sod. (2001). Iz pregleda literature je razvidno, da so obsežne študije različnih območij sveta z uporabo molekularnih tipizacijskih metod identificirale številne klone proti antibiotikom odpornih pnevmokokov, ki so dosegli pomembno geografsko razpršenost v okviru posameznih držav in v nekaterih primerih prek mednarodnih meja (McGee in sod., 2001).

Razlog za uspešno širjenje posameznih klonov še ni dobro poznan. Odporni kloni se širijo kljub celotni zmanjšani porabi antibiotikov, kar kaže na to, da je selekcija teh klonov lahko tudi posledica dejavnikov, drugačnih od tistih, povezanih z odpornostjo proti antibiotikom (Sjöström in sod., 2007).

Poimenovanje, leto osamitve, državo prve osamitve in razširjenost sedmih predstavnikov mednarodno razširjenih odpornih klonov bakterije *S. pneumoniae* vključenih v PMEN (angl. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network) prikazujemo v Preglednici 3.

Preglednica 3: Značilnosti sedmih predstavnikov mednarodno razširjenih klonov

Poimenovanje	Leto osamitve	Država prve osamitve	Razširjenost
England <sup>14</sup> -9	ni podatka	Anglija	Velika Britanija, Portugalska, Italija, Grčija, Belgija, Nemčija, ZDA, Avstralija, Južna Amerika
Spain <sup>14</sup> -5	1990	Španija	Španija, ZDA
Spain <sup>9V</sup> -3	1993	Španija in Francija	Španija, Francija, Portugalska, Italija, Poljska, Bolgarija, Švedska, Grčija, Nizozemska, Nemčija, Danska, Češka, Velika Britanija, ZDA, Kanada, Južna Amerika, Azija
Spain <sup>6B</sup> -2	1988	Španija	Španija, Francija, Nizozemska, Nizozemska, Irska, Portugalska, Nemčija, Finska, Velika Britanija, ZDA, Južna Amerika, Azija, Avstralija
Poland <sup>6B</sup> -20	ni podatka	Poljska	Poljska, Portugalska, Bolgarija, Italija
Hungary <sup>19A</sup> -6	1989	Madžarska	Madžarska, Češka in Slovaška
Taiwan <sup>19F</sup> -14	1997	Tajvan	Tajvan, Hong Kong, Vietnam, Južna Afrika, Velika Britanija, Grčija, ZDA, Avstralija

Podatki so povzeti po navedbah McGee in sod. (2001), molekularno-epidemiološki mreži PMEN in ATCC zbirk.

Predstavniki mednarodnih klonov so v molekularno-epidemiološki mreži PMEN poimenovani po sledečem sistemu:

država<sup>prvi identificirani serotip</sup>-zaporedna številka v PMEN.

Tako na primer v poimenovanju England<sup>14</sup>-9 predstavlja England državo v kateri je bil klon prvič opredeljen (na podlagi objave), torej Anglijo, 14 serotip prvič opredeljenega klena in 9 številko klona.

Do danes so prepoznali in opisali več uspešnih mednarodnih klonov z determinantami odpornosti proti antibiotikom. Pojav pnevmokoknih bolezni, ki jih povzročajo proti penicilinu odporni in večkratno odporni pnevmokoki, je postal globalna skrb, zato se je pojavila potreba po identifikaciji epidemiološkega širjenja teh sevov. Tako je bila leta 1997

ustanovljena mednarodna molekularno-epidemiološka mreža, imenovana PMEN, z namenom globalnega nadzora odpornosti proti antibiotikom ter standardizacije nomenklature in klasifikacije odpornih klonov bakterije *S. pneumoniae* (McGee in sod., 2001). Trenutno PMEN opisuje 26 mednarodnih klonov, ki so dostopni v javni zbirkvi sevov ATCC (angl. American type culture collection). Nekateri med njimi so globalno razširjeni, o njihovi prisotnosti in različni odpornosti proti antibiotikom so namreč poročali iz mnogih držav (Pletz in sod., 2007).

Klon Spain<sup>9V</sup>-3 sekvenčnega tipa (ST) 156 je eden izmed najuspešnejših klonov pnevmokokov z zmanjšano občutljivostjo za penicilin. Poleg odpornosti proti penicilinu izraža tudi odpornost proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. Razširjen je v večini evropskih držav in prisoten na vseh kontinentih. Sevi, ki pripadajo klonskemu kompleksu ST156, izražajo različne serotipe, kot so 6B, 9A, 11A, 14, 15B/C, 19A, 19F, 23F in 24F, kar kaže na veliko nagnjenost tega klonskega kompleksa k preklopu tipa kapsule (Sjöström in sod., 2007).

Raziskave primerjalne genomike so pokazale, da imajo sevi pnevmokokov, ki so neobčutljivi za penicilin in pripadajo klonu Spain<sup>9V</sup>-3, otok patogenosti *rlrA* (Sjöström in sod., 2007). Slednji kodira piluse, ki pnevmokokom olajšujejo naseljevanje nosno-žrelnega prostora in pri živalih prispevajo k virulenci, kar je razkrila študija preživetja in bremena bakterij v živalskem modelu intranasalne okužbe, ki so jo izvedli Barocchi in sod. (2006).

Ugotovitve študije, ki so jo izvedli Sjöström in sod. (2007), kažejo na to, da se je Spain<sup>9V</sup>-3 razvil iz za penicilin občutljivega prednika, ki je že imel piluse (ST162), in da izražanje adhezivnih pilusov Spain<sup>9V</sup>-3 sevom v nosno-žrelnem prostoru omogoča prednost v tekmovanju z drugimi za penicilin neobčutljivimi sevi, ki pilusov ne izražajo. Iz tega lahko sklepamo, da je izražanje pilusov pomemben biološki dejavnik, ki lahko prispeva h globalnemu širjenju Spain<sup>9V</sup>-3 in drugih uspešnih za penicilin neobčutljivih klonov. Na Švedskem, v državi, kjer nizka uporaba antibiotikov ne pojasni širjenja odpornih sevov, vsaj 70 % za penicilin neobčutljivih sevov, zbranih v letu 2003, nosi otok patogenosti *rlrA* (Sjöström in sod., 2007).

## 2.8 ZDRAVLJENJE PNEVMOKOKNIH OKUŽB

Večino pnevmokoknih okužb je mogoče učinkovito zdraviti z antibiotiki. Zelo pomembno je, da okužbe zgodaj prepoznamo. Pri bolnikih, pri katerih izoliramo občutljive seve bakterije *S. pneumoniae*, je penicilin zdravilo prvega izbora, če zanj niso preobčutljivi. Vendar so v zadnjih desetletjih pnevmokoki postali nanj in na druge antibiotike vse bolj odporni, kar zdravljenje otežuje in povečuje tveganje za smrtni izid bolezni (Sjöström in sod., 2007; Lydyard in sod., 2009). V tem primeru zdravimo glede na rezultate antibiograma. Doslej so kot učinkoviti antibiotiki v zdravljenju pnevmokoknih okužb, ki jih povzročajo proti penicilinu odporni sevi pnevmokokov, veljali cefotaksim, ceftriakson in klindamicin. Vendar v zadnjem času vse pogosteje odkrivajo pnevmokoke, ki so odporni tudi proti cefalosporinom tretje generacije, kot sta cefotaksim in ceftriakson. V primerih okužb s takimi sevi je priporočeno zdravljenje s klindamicinom ali vankomicinom (Seme, 2002; Lydyard in sod., 2009).

## 2.9 PREPREČEVANJE PNEVMOKOKNIH OKUŽB

Med otroki do petega leta starosti je veliko število zdravih klicenoscev, zato je prenos *S. pneumoniae* s splošnimi preventivnimi ukrepi težko preprečevati (Stantič Pavlinič in Pavlinič, 2008). Najbolj zanesljivo je mogoče pnevmokokno okužbo preprečiti s cepljenjem, ki prav zaradi naraščanja deleža odpornih pnevmokokov postaja vse bolj pomembno (Gianfaldoni in sod., 2007). Cepiva, ki so trenutno na tržišču, delujejo izključno proti kapsularnim polisaharidom pnevmokokov in zagotavljajo striktno serotipsko specifično zaščito (Kadioglu in sod., 2008).

Trenutno je na tržišču več vrst cepiv. **Polisaharidno 23-valentno pnevmokokno cepivo** (PPV23), ki vsebuje antigene 23 serotipov, ki najpogosteje povzročajo invazivne pnevmokokne bolezni po vsem svetu, se uporablja pri cepljenju odraslih in otrok, starejših od dveh let starosti. Pri zdravih odraslih in starejših odraslih omogoča 60 do 80 % zaščito pred invazivnimi pnevmokoknimi okužbami, vendar je njegova učinkovitost manjša pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Lynch in Zhanel, 2009). Prav tako so polisaharidna cepiva slabo imunogena pri dojenčkih in otrocih, mlajših od dveh let starosti, saj je imunost proti polisaharidnim antigenom posredovana le preko B-limfocitov in je od T-celic pomagalk neodvisna. Pri dojenčkih in otrocih, mlajših od dveh let, je ta imunost še

nezrela in zato PPV23 v tej starostni skupini ni imunogeno in ne vzbudi imunskega spomina. Z vezavo polisaharidnih antigenov na nosilno beljakovino so razvili konjugirana cepiva, ki spodbudijo T-celični odziv in so tako učinkovita tudi pri dojenčkih in otrocih, mlajših od dveh let (Kadioglu in sod., 2008).

Leta 2000 so v ZDA registrirali novo **7-valentno konjugirano pnevmokokno cepivo** (PCV7), katerega uporaba je danes dovoljena že v več kot 100 državah sveta (Pfizer receives ..., 2009). Tudi to cepivo zagotavlja serotipsko specifično zaščito in vsebuje polisaharidne antogene proti sedmim serotipom pnevmokokov, ki pri otrocih najpogosteje povzročijo invazivne okužbe (Kadioglu in sod., 2008). Primerno je za cepljenje otrok že po dopolnjenem drugem mesecu starosti, zaradi bolj učinkovite zaščite pa ga zdravniki priporočajo otrokom vse do petega leta starosti. Študije, opravljene v ZDA v obdobju petih let, so pokazale, da je rutinsko cepljenje dojenčkov s PCV7 znižalo incidenco invazivnih pnevmokoknih okužb pri otrocih, starih manj kot pet let, za 77 % v primerjavi z obdobjem pred uvedbo cepljenja (Stantič Pavlinič in Pavlinič, 2008). Poročajo tudi o znižanju incidence nosilstva teh serotipov v nosno-žrelnem prostoru cepljenih dojenčkov in otrok, podoben učinek so opazili tudi pri necepljenih dojenčkih in otrocih, kar je posledično povzročilo zmanjšanje nosilstva in bolezni tudi pri odraslih. Gre torej za pojav kolektivne imunosti (Dagan in Klugman, 2008).

Kljub uspešnosti PCV7 so številne študije pokazale, da so se v nosno-žrelnem prostoru kmalu po njegovi uvedbi pojavili pnevmokokni serotipi, pred katerimi nas cepivo ne zaščiti, t. i. nadomestni serotipi. S tem se je povečala incidenca pnevmokoknih bolezni, povzročenih s temi serotipi, in hkrati je narasla tudi njihova odpornost proti antibiotikom (Dagan in Klugman, 2008). Lynch in Zhanel (2009) navajata, da je trenutno v ZDA najpogostejši nadomestni serotip 19A, medtem ko sta 1 in 5 najpogostejša v Španiji. Na nekaterih geografskih področjih je ta širitev potekala klonalno. Pojavnost serotipa 19A, ki je odporen proti antibiotikom in pogost vzrok invazivnih bolezni, se povečuje po vsem svetu, tudi v državah, kjer cepljenja s PCV7 še niso uvedli (Dagan in Klugman, 2008). Hicks in sod. (2007) omenjajo več možnih razlag, zakaj je serotip 19A postal prevladujoči nadomestni serotip. Pred uvedbo cepljenja s PCV7 je ta serotip med vsemi serotipi, ki jih cepivo ne vsebuje, najpogosteje naseljeval nosno-žrelni prostor in je bil prav tako pogosto

odporen proti antibiotikom. Možna razloga je tudi, da kapsula serotipa 19A lahko omogoča večjo invazivnost tega serotipa kot ostalih, ki niso vključeni v PCV7.

Zaskrbljujoča je možnost, da bi lahko čez čas ob široko razširjeni uporabi cepiva prišlo le do spremenjene razširjenosti serotipov, ki povzročajo invazivne pnevmokokne bolezni, in ne zmanjšanja celotnega bremena teh bolezni. Poleg tega je cena konjugiranega cepiva visoka in je zato malo verjetno, da bo prišlo do njegove razširjene uporabe v državah v razvoju, kjer je stopnja smrtnosti otrok zaradi invazivnih pnevmokoknih bolezni najvišja (Kadioglu in sod., 2008).

Uvedba cepljenja s pnevmokoknimi konjugiranimi cepivi poleg preprečevanja okužb predstavlja tudi nov pristop k zmanjšanju odpornosti bakterij proti antibiotikom (Čižman, 2005). Vemo namreč, da večina klinično pomembnih, proti antibiotikom odpornih sevov *S. pneumoniae* pripada sedmim serotipom, in da pet (6B, 9V, 14, 19F, 23F) od sedmih sestavlja PCV7, preostala dva serotipa (6A, 19A) pa sta imunološko povezana s serotipi v cepivu, vendar je cepivo učinkovalo le na zmanjšano pojavljanje serotipa 6A (Dagan in Klugman, 2008). Čižman (2005) navaja, da pnevmokokna konjugirana cepiva prekinejo prenos in širjenje proti antibiotikom odpornih sevov s tem, da blokirajo pridobitev serotipov, ki jih cepivo vsebuje.

Konjugirana cepiva, ki ščitijo proti večjemu številu serotipov, so trenutno v končni fazi razvoja ali jih že ocenjujejo agencije za zdravila (Bechini in sod., 2009). Na svetovnem trgu je po več letih raziskav in mnogih opravljenih študijah od leta 2009 navzoče tudi 10-valentno konjugirano pnevmokokno cepivo (Synflorix<sup>TM</sup> ..., 2009). Dovoljenje za uporabo je v nekaterih državah že dobilo tudi 13-valentno konjugirano pnevmokokno cepivo, ki poleg sedmih serotipov vključenih v PCV7 med dodatnimi šestimi serotipi vsebuje tudi 19A, in trenutno predstavlja cepivo z zaščito proti največjemu številu najbolj razširjenih invazivnih serotipov, ki povzročajo bolezni pri majhnih otrocih po vsem svetu (Pfizer receives ..., 2009).

### **2.9.1 Prihodnost v razvoju cepiv**

Zaradi predhodno opisanih slabosti pri polisaharidnih in konjugiranih pnevmokoknih cepivih je danes razvoj usmerjen v visoko imunogena cepiva, ki morajo izzvati imunološki spomin tudi pri otrocih, mlajših od dveh let, in katerih zaščita temelji na pnevmokoknih

virulentnih beljakovinah, skupnih vsem serotipom. Visoka raven izražanja beljakovinskih antigenov v rekombinantnih bakterijah omogoča proizvodnjo cepiv v velikem obsegu in z nižjimi stroški, s čimer bi bila bolj dostopna predvsem državam v razvoju (Kadioglu in sod., 2008).

Trenutne raziskave se osredotočajo na beljakovinske antogene kot potencialne kandidate cepiv, ki bi lahko zagotovili serotipsko-neodvisno zaščito (Gianfaldoni in sod., 2007). Znanstveniki so preučili že več beljakovinskih antigenov, od katerih jih je le malo prišlo do prve in druge faze kliničnih preizkušanj. Med najbolj preučevanimi so pnevmolizin, PspA, CbpA in beljakovine histidinske triade. Imunizacija z vsako od teh beljakovin je zagotovila različne stopnje zaščite proti enemu ali več sevom pnevmokokov v mišjih modelih preučevanja sepse, pljučnice ali nosilstva. Dokazali so, da imunizacija z določenimi kombinacijami pnevmokoknih virulentnih beljakovin lahko zagotavlja dodatno ali celo sinergistično zaščito (Barocchi in sod., 2007; Kadioglu in sod., 2008).

Gianfaldoni in sod. (2007) so v svoji raziskavi dokazali, da tudi komponente pilusa, ki jih imajo nekateri sevi pnevmokokov, v miših izzovejo zaščito pred pnevmokokno okužbo. Pilusni antigeni lahko nudijo zaščito le pred manjšo skupino serotipov bakterije *S. pneumoniae* (Aguiar in sod., 2008), a kombinacija ene ali več pilusnih podenot z drugimi zaščitnimi beljakovinskimi antigeni bi lahko privedla do še bolj učinkovitega cepiva (Gianfaldoni in sod., 2007). S tako pripravljenim cepivom bi namreč lahko preprečili pojavljanje in omejili širjenje nekaterih večkratno odpornih klonov, ki imajo piluse in so še posebej nagnjeni h kolonizaciji nosno-žrelnega prostora zdravih nosilcev. S tem bi lahko odpravili pomemben rezervoar odpornosti na antibiotike pri pnevmokokih danes in v prihodnosti (Sjöström in sod., 2007).

## 2.10 TIPIZACIJA

Tipizacija je postopek ugotavljanja razlik in posledično določanja sorodnosti med mikroorganizmi znotraj vrste. Z različnimi tipizacijskimi metodami pojasnjujemo epidemije okužb, iščemo vire epidemij, raziskujemo poti prenosa in širjenje mikroorganizmov ter prepoznavamo seve z večjim potencialom širjenja. Njihova uporaba je izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni in širjenja pomembnejših svetovno razširjenih bakterijskih klonov (van Belkum in sod., 2007).

### **2.10.1 Pomen tipizacije pnevmokoknih sevov**

Pojav sevov *S. pneumoniae*, odpornih proti penicilinu in drugim antibiotikom, ter njihovo širjenje po vsem svetu je postalo glavna skrb protimikrobnega zdravljenja okužb, povzročenih s temi sevi, in je povečalo potrebo po njihovem epidemiološkem spremljanju (Lefevre in sod., 1993). Kvalitetni epidemiološki nadzor omogoča uporaba dobrih tipizacijskih metod, ki lahko hitro in zanesljivo razlikujejo med nesorodnimi bakterijskimi sevi (van Belkum in sod., 2007). Lastnosti dobre tipizacijske metode so sposobnost opredelitve vsakega seva, ločljivost, torej sposobnost prepozname sorodnih sevov kot sorodnih in obratno, ponovljivost, lahka izvedba in interpretacija, dostopnost in nizka cena (van Belkum in sod., 2001). Na splošno velja, da so fenotipske metode dostopnejše in lažje za izvedbo, medtem ko genotipske odlikuje boljša ločljivost in zmožnost, da z njimi opredelimo vse seve. Vseh predhodno opisanih lastnosti namreč ne združuje nobena od tipizacijskih metod.

Fenotipske tipizacijske metode so starejše in opišejo produkte genske ekspresije bakterij. Konvencionalne fenotipske tipizacijske metode, kot so biotipizacija, serotipizacija in antibiogramska tipizacija, so v preteklosti veliko prispevale k razumevanju epidemiologije pnevmokoknih bolezni. V uporabi so še danes, a imajo številne praktične omejitve, zaradi katerih so manj primerne za obsežne študije strukture in dinamike bakterijskih populacij ter tudi za prizadevanja kontrole in nadzora okužb. Večino fenotipskih tipizacijskih metod so razvili za določeno bakterijsko vrsto in zato niso splošno uporabne. Ker se fenotipske lastnosti ne izrazijo vedno, niso dober epidemiološki pokazatelj. Zato jih v zadnjih dveh desetletjih zamenjuje ali dopoljuje uporaba genotipskih tipizacijskih metod (van Belkum in sod., 2007).

### **2.10.2 Genotipske tipizacijske metode**

Bakterijski sevi se glede na njihovo nukleotidno zaporedje genoma med seboj lahko bolj ali manj razlikujejo. Tako lahko z različnimi genotipskimi tipizacijskimi metodami na podlagi genetskih razlik med sevi določimo njihovo medsebojno podobnost oz. sorodnost (van Belkum in sod., 2007). Obstaja kar nekaj tipizacijskih metod, ki temeljijo na analizi nukleotidnega zaporedja bakterijske DNA, s katerimi lahko razlikujemo med sevi *S.*

*pneumoniae*, kar omogoča globlji in bolj podroben vpogled v razširjenost in širjenje pnevmokoknih sevov.

Dve pogosto uporabljeni genotipski tipizacijski metodi za tipizacijo *S. pneumoniae* sta elektroforeza v pulzirajočem električnem polju, PFGE (angl. pulsed-field gel electrophoresis), in tipizacija na osnovi zaporedij več lokusov, MLST (angl. multilocus sequence typing). Med pnevmokoki imajo lahko sevi istega serotipa različni restriktijski vzorec DNA in so različnega sekvenčnega tipa. Vendar obstaja tudi možnost, da imajo sevi različnih serotipov enako genetsko ozadje, kar pomeni, da imajo isti restriktijski vzorec DNA in so istega sekvenčnega tipa (Sjöström, 2007). Z uporabo obeh metod, PFGE in MLST, lahko določimo, v kolikšni meri so tipizirani sevi med seboj genetsko sorodni, ter z rezultati primerjave genetsko sorodnih izolatov s predstavniki mednarodnih priznanih klonov sklepamo o njihovi klonalni pripadnosti (Mc Gee in sod., 2001; Pletz in sod., 2007).

Z naraščanjem odpornosti pnevmokoknih sevov proti antibiotikom je postalo pomembno združevanje molekularno-epidemioloških podatkov s podatki o klinični sliki, saj ti lahko razkrijejo pomembne informacije o tem, ali so določeni serotipi in kloni pnevmokokov odporni proti antibiotikom in ali povzročajo invazivne bolezni in/ali zgolj naseljujejo nosno-žrelni prostor. Ali sevi in kloni, ki krožijo v populaciji, lahko povzročijo invazivne pnevmokokne bolezni, namreč lahko ugotovimo s primerjavo genotipa seva z genotipi sevov, za katere je znano, da povzročajo invazivne bolezni (Obert in sod., 2007; Sjöström, 2007). Molekularno-epidemiološke študije o pnevmokoknih okužbah in njihovem širjenju so pomembne tudi v raziskavah o temeljnih sestavinah cepiv (Sjöström, 2007).

#### 2.10.2.1 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju

Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju ali PFGE je referenčna metoda za genotipsko tipizacijo večine bakterijskih vrst, tudi *S. pneumoniae* (Shaaly in sod., 2005), ki omogoča ločevanje zelo velikih molekul DNA (do 12 milijonov bp) (Herschleb in sod., 2007).

Celotno genomsko DNA cepimo z restriktijskimi endonukleazami, encimi, ki imajo prepoznavna mesta dolga 6 ali več bp. Z restrikcijo običajno dobimo manj kot 30 makrorestriktijskih fragmentov DNA, velikih od 20 do 600 kbp (van Belkum in sod.,

2007). Za tipizacijo *S. pneumoniae* se najpogosteje uporablja restriktijski encim *Sma*I, pri katerem z restrikcijo dobimo približno od 10 do 19 makrorestriktijskih fragmentov DNA, velikosti od 20 do 300 kbp (Tenover in sod., 1995).

S periodičnim spremjanjem kota smeri električnega toka morajo molekule DNA ob vsaki zamenjavi spremeniti smer potovanja. Hitrost potovanja molekul je odvisna od njihove velikosti. Večje molekule so bolj okorne in težje spremenijo smer potovanja kot manjše molekule in zato po gelu potujejo počasneje (Herschleb in sod., 2007). Za vsak tipiziran sev z restrikcijo genomske DNA dobimo določeno število makrorestriktijskih fragmentov DNA različnih velikosti, ki se na gelu ločijo in po končani elektroforezi v pulzirajočem električnem polju tvorijo specifičen restriktijski vzorec DNA. S primerjavo restriktijskih vzorcev DNA med sevi lahko določimo njihovo medsebojno sorodnost. (Singh in sod., 2006).

Za interpretacijo restriktijskih vzorcev DNA, dobljenih s PFGE, se pogosto uporabljajo merila za določanje stopnje sorodnosti, ki jih je objavil Tenover s sodelavci (1995). Od uvedbe PFGE pred več kot 25 leti so razvili številne elektroforezne sisteme kot tudi velik nabor protokolov izvajanja same metode. Nekatere so standardizirali in s tem omogočili sprejemljivo medlaboratorijsko primerjavo in oblikovanje mednarodnih podatkovnih zbirk z restriktijskimi vzorci DNA sevov *S. pneumoniae*. Prav tako so za medsebojno primerjavo velikega števila vzorcev razvili računalniške programe, ki lahko izračunajo stopnjo sorodnosti med sevi. Na splošno velja, da seve opredelimo kot genetsko neločljive, kadar je njihova stopnja sorodnosti 100 %. Če stopnja sorodnosti znaša več kot 80 %, seve opredelimo kot klonalno povezane. Restriktijske vzorce na gelih je potrebno natančno in pozorno preučiti kljub danes omogočeni digitalizaciji in računalniški obdelavi (Singh in sod., 2006; van Belkum in sod., 2007; Herschleb in sod., 2008).

PFGE je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo (Singh in sod., 2006). Slabost metode sta razmeroma draga oprema in daljši čas (dva do štiri dni), ki je potreben, da dobimo rezultate (van Belkum in sod., 2007).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

V raziskavo smo vključili 47 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov, izoliranih v letu 2004. Iz odraslih bolnikov je bilo izoliranih 31 in iz otrok 16 sevov. Seve so na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo IVZ RS zbrali iz vseh regionalnih Zavodov za zdravstveno varstvo (Maribor, Celje, Kranj, Novo mesto, Nova Gorica, Murska Sobota, Koper), Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Splošne bolnišnice Nova Gorica in Slovenj Gradec ter Bolnišnice Golnik v okviru nacionalnega projekta z naslovom »Epidemiologija invazivnih obolenj, povzročenih s *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* in *Streptococcus pneumoniae* pri otrocih v Sloveniji«. Projekt poteka od leta 1993 in so ga leta 1996 razširili tudi na odrasle bolnike.

Pnevmoniki so bili osamljeni iz krvi, likvorja oz. likvorja in krvi hkrati, aspiratov ali punktatov sterilnih telesnih tekočin, saj smo preučevali seve, ki so bili osamljeni pri bolnikih z invazivnimi pnevmokoknimi obolenji.

V okviru rednega dela v laboratoriju Oddelka za medicinsko mikrobiologijo IVZ RS so vsem sevom potrdili identifikacijo s pomočjo klasičnih mikrobioloških metod, določili serotip z reakcijo nabrekanja kapsule ali Neufeld-Quellungovo reakcijo z monoklonskimi protitelesi (Statens Serum Institut, Danska), določili odpornost proti antibiotikom v skladu s standardi CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) z metodo difuzije v agarju z diskami in z določitvijo minimalne zaviralne koncentracije za antibiotike z E-testi (AB biodisk, Švedska).

V laboratoriju Oddelka za medicinsko mikrobiologijo IVZ RS vse testirane seve hrani pri temperaturi -70 °C ter tako vzdržujejo banko sevov.

### 3.1.2 Standardni sevi

Za kontrolo pravilnega izvajanja postopkov molekularne tipizacije smo uporabili standardni kontrolni sev *Staphylococcus aureus* z oznako NCTC 8325.

Da bi odkrili, ali so proti penicilinu odporni invazivni sevi pnevmokokov sorodni kateremu izmed predstavnikov mednarodnih odpornih in večkratno odpornih klonov, vključenih v PMEN in dostopnih v javnih zbirkah sevov, smo jih primerjali z izbranimi sevi iz zbirke ATCC (angl. American type culture collection):

- **England<sup>14</sup>-9** z oznako ATCC 700676 odporen proti eritromicinu,
- **Spain<sup>14</sup>-5** z oznako ATCC 700902 odporen proti kloramfenikolu in tetraciklinu,
- **Spain<sup>9V</sup>-3** z oznako ATCC 700671 odporen proti penicilinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom ,
- **Spain<sup>6B</sup>-2** z oznako ATCC 700670 odporen proti kloramfenikolu, penicilinu in tetraciklinu,
- **Poland<sup>6B</sup>-20** z oznako ATCC BAA-612 odporen proti več antibiotikom, vendar v ATCC zbirki ni navedeno proti katerim,
- **Hungary<sup>19A</sup>-6** z oznako ATCC 700673 odporen proti kloramfenikolu, eritromicinu, penicilinu, tetraciklinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom,
- **Taiwan<sup>19F</sup>-14** z oznako ATCC 700905 odporen proti eritromicinu, penicilinu in tetraciklinu.

Standardni sevi so bili do testiranja shranjeni pri temperaturi – 70 °C.

### 3.1.3 Laboratorijski pribor in oprema

Sterilizirana steklovina in potrošni material: cepilne zanke, mikrocentrifugirke (1,5 mL), petrijeve plošče, skalpeli, erlenmajerice, graduirani merilni valji (50 mL, 500 mL, 2 L), pladnji, plastična stojala, staničevina, nastavki za avtomatske pipete, kapalke, stekleničke s plastičnimi zamaški.

Zaščitna oprema: halja, rokavice, zaščitne maske z elastiko.

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- sterilna brezprašna komora (Biosafe 2, EHRET),
- denzitometer (bioMérieux, Francija),
- mikrocentrifuga (Mini spin, Eppendorf, Nemčija),
- termo blok (Digi-Block<sup>TM</sup>, Laboratory devices, ZDA),
- električni stresalnik (Vibromix 314 EVT, Tehtnica, Slovenija),
- GenePath elektroforezni sistem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA),
- vodna kopel (GFL, Nemčija),
- dokumentacijski sistem Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA).

### 3.1.4 Gojišče, raztopine in reagenti

- krvni agar (KA),
- 0,85-odstotna fiziološka raztopina NaCl (bioMérieux, Francija),
- voda z odstranjenimi nukleazami (Qiagen, Nemčija).

Raztopine, reagenti in materiali, ki jih vsebuje komercialni komplet »GenePath Group 1« kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA):

- pufer za pripravo celične suspenzije,
- agaroza za vklapljanje celic,
- pufer za proteolizo,
- proteinaza K ( $> 600 \text{ U/mL}$ ),
- 10x pufer za spiranje,
- modelček za pripravo agaroznih blokcev,
- pufer za lizo,
- lizocim (25 mg/mL)/lizostafin (2 mg/mL),
- pufer, specifičen za encim *SmaI*,
- restriktijski encim *SmaI* (5 U/ $\mu\text{L}$ ),
- agarozni blokci z DNA označevalcem molekulske mase znane velikosti Lambda,
- agarozni blokci, ki vsebujejo kontrolni sev *S. aureus* (NCTC 8325) za potek restrikcije,
- pufer za elektroforezo (20x),
- 1-odstotna agaroza,
- 1-odstotna agarosa z nizkim tališčem,
- etidijev bromid (1 mg/mL),
- liofilizirana kultura *S. aureus* (NCTC 8325).

Pripravili smo 1x in 0,1x pufer za spiranje. 1x pufer za spiranje smo pripravili tako, da smo v sterilni steklenički zmešali 50 mL 10x pufra za spiranje in 450 mL vode z odstranjenimi nukleazami. Tako pripravljenih 5 mL 1x pufra za spiranje smo v novi steklenički zmešali s 45 mL vode z odstranjenimi nukleazami in pripravili 0,1x pufer.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Analiza kromosomske DNA z gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE)

V naši raziskavi smo proti penicilinu odporne invazivne seve pnevmokokov, izoliranih v Sloveniji v letu 2004, in izbrane seve mednarodnih večkratno odpornih klonov tipizirali z metodo PFGE. Uporabili smo komercialni kompletni reagent »GenePath Group 1« kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA) z restriktičnim encimom *Sma*I in postopek tipizacije izvedli v skladu z navodili proizvajalca.

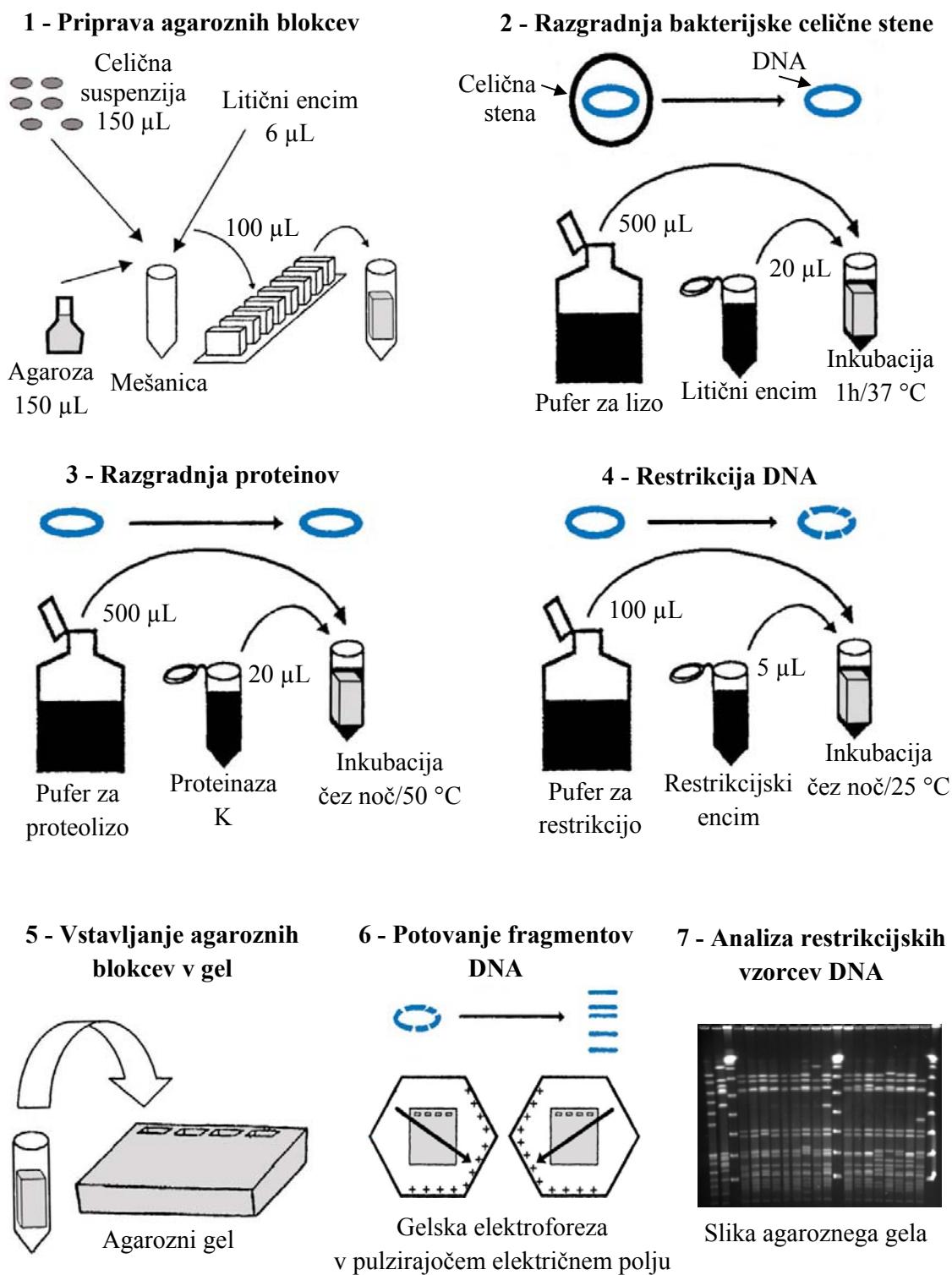
Kontaminacija z DNazami na katerikoli stopnji izvajanja postopka bi onemogočila analizo, zato smo pri delu vedno uporabljali rokavice (DNaze so naravno prisotne na koži) in le sterilno vodo ter steriliziran material.

##### 3.2.1.1 Priprava bakterijskih sevov in bakterijske suspenzije

Pripravo bakterijskih sevov in bakterijske suspenzije smo izvedli v sterilni brezprašni komori pod sterilnimi pogoji. Pri delu smo uporabljali rokavice in aseptično tehniko dela. Tako smo preprečili možnost kontaminacije vzorcev in možnost okužbe med delom.

Zamrznjene seve smo najprej odmrznili in jih nacepili na osnovno gojišče krvni agar (KA). Po 24-urni inkubaciji pri temperaturi  $36 \pm 1$  °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> smo jih precepili na KA in nato ponovno inkubirali 24 ur pri temperaturi  $36 \pm 1$  °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Ob plinskem gorilniku smo s cepilno zanko kolonije čiste kulture seva prenesli v 3 mL 0,85-odstotne fiziološke raztopine NaCl in s pomočjo denzitometra umerili gostoto bakterijske suspenzije na 2,5 McF (McFarland).

Slika 7 ponazarja potek dela z metodo PFGE.



Slika 7: Shema poteka dela

### 3.2.1.2 Priprava agaroznih blokcev

Zaradi velike dolžine DNA molekul že enostavno pipetiranje lahko poškoduje kromosomsko DNA, ki je tako nesprejemljive kakovosti za PFGE ločevanje. Da bi preprečili lomljenje večjih molekul DNA, smo nepoškodovane bakterijske celice vklopili v agarozo, lizirali in odstranili beljakovine in situ.

V sterilno mikrocentrifugirko smo prenesli 1 mL suspenzije celic in centrifugirali v mikrocentrifugi 2 minuti pri 12000 vrt./minuto. Po končanem centrifugiranju smo z avtomatsko pipeto odstranili supernatant in usedlino celic previdno resuspendirali v 150 µL pufra za pripravo celične suspenzije. Temperaturo vzorcev smo uravnali v termo bloku na 50 °C.

150 µL celične suspenzije smo dodali 6 µL lizocima/lizostafina in jo vklopili v 150 µL raztopljene agaroze, ohlajene v termo bloku na 50 °C, da se pri nadaljnji obdelavi DNA ne bi razlomila. Po 100 µL tako pripravljene mešanice smo prenesli v modelček za pripravo agaroznih blokcev in ga pustili 15 do 20 minut na sobni temperaturi, da so se agarozni blokci strdili. Če smo želeli strjevanje pospešiti, smo modelček za 10 do 15 minut postavili na 4 °C.

S spodnje strani modelčka za pripravo agaroznih blokcev smo odstranili trak. Z lopatico, odlomljenim delom modelčka, smo potisnili strjene agarozne blokce v pripravljene sterilne mikrocentrifugirke, v katere smo odpipetirali 500 µL pufra za lizo in 20 µL lizocima/lizostafina. Strjene agarozne blokce smo tako inkubirali 1 uro pri temperaturi 37 °C brez stresanja.

Po končani inkubaciji smo s pipeto odstranili pufer za lizo in sprali agarozne blokce s približno 1 mL 1x pufra za spiranje sobne temperature. Pufer za spiranje smo odstranili, inkubacija ni bila potrebna.

V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 500 µL pufra za proteolizo in 20 µL proteinaze K ter inkubirali čez noč v termo bloku brez stresanja pri temperaturi 50 °C.

Naslednji dan smo odstranili pufer s proteinazo K in agarozne blokce štirikrat sprali v 1 mL 1x pufra za spiranje tako, da smo jih štirikrat inkubirali v 1x pufru za spiranje od 30 do 60 minut pri sobni temperaturi ob blagem stresanju na električnem stresalniku.

### 3.2.1.3 Restrikcija genomske DNA v agaroznih blokcih

Po spiranju smo v sterilno petrijevko vlili vsebino mikrocentrifugirke z agaroznim blokcem. S skalpelom smo blokec razrezali na tretjine vzdolž ožje osi na približno 1,5 x 5 mm velike koščke. Tretjino agaroznega bloka smo prenesli v novo 1,5 mL sterilno mikrocentrifugirko, v katero smo odpipetirali 1 mL 0,1x pufra za spiranje, in spirali 30 do 60 minut pri sobni temperaturi ob blagem stresanju na stresalniku. Enako smo naredili z agaroznim blokcem, ki je vseboval kontrolni sev, da bi se prepričali o pravilnem poteku restrikcije.

Po spiranju smo 0,1x pufer odstranili in v vsako mikrocentrifugirko odpipetirali 500 µL pufra, specifičnega za encim *SmaI*, s katerim smo izvedli restrikcijo, in inkubirali 30 do 60 minut pri sobni temperaturi ob blagem stresanju na stresalniku.

Po končani inkubaciji smo odstranili pufer, specifičen za *SmaI*, in dodali 100 µL enakega pufra ter 5 µL encima *SmaI* (25 U/blokec). Blokce smo v restrikcijski mešanici inkubirali preko noči pri sobni temperaturi.

Po končani restrikciji smo restrikcijsko mešanico odstranili in v vsako mikrocentrifugirko odpipetirali 500 µL 1x pufra za spiranje.

### 3.2.1.4 Gelska elektroforeza

Makrorestrikcijske fragmente DNA smo ločili v 1-odstotnem agaroznem gelu. Elektroforezo smo izvedli na GenePath elektroforeznem sistemu na programu 12, ki je po navodilih proizvajalca priporočen za analizo kromosomske DNA bakterije *S. pneumoniae*.

#### 3.2.1.4.1 Vstavljanje agaroznih blokcev v gel za elektroforezo

Agarozo za pripravo gela in agarozo z nizkim tališčem smo segrevali v mikrovalovni pečici in ju, ko je bila vsa agariza raztopljena, v vodni kopeli ohladili na 50 °C.

Poleg vzorcev, ki smo jih testirali, smo na gel vsakič nanesli tudi DNA označevalce molekulske mase znane velikosti Lambda. Iz že pripravljenega večjega agaroznega bloka z označevalcem molekulske mase Lambda smo odrezali 2 ali 3 blokce enake velikosti kot so bili blokci testiranih vzorcev. Položili smo jih v 1,5 mL-sterilno mikrocentrifugirko,

dodali 1 mL 1x pufra za spiranje in inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 50 °C 10 minut.

Sestavili smo okvir za vlivanje gela. Agarozne blokce z bakterijsko DNA smo s čisto lopatico nanesli na zobe glavnika za pripravo gela. Zunanje zobe glavnika, pri glavniku s 30 zobmi tudi en zob na sredini, smo prihranili za agarozne blokce z DNA označevalcem molekulske mase znane velikosti Lambda, preostale pa za vzorce. S staničevino smo previdno odstranili preostali pufer. Vsak blokec smo zalili s kapljico agaroze z nizkim tališčem, da se je obdržal na mestu, in pustili, da se je agarosa strdila.

Ohlajeno agarozo za pripravo gela smo previdno vlili v okvir za vlivanje gela, kamor smo že prej postavili glavnik z našimi vzorci tako, da so bili agarozni blokci obrnjeni proti večji površini okvirja. Po približno 30 do 60 minutah smo iz strjenega gela previdno odstranili glavnik in razstavili okvir.

#### 3.2.1.4.2 Priprava PFGE sistema za analizo

Pripravili smo pufer za elektroforezo. 100 mL 20x pufra smo vlili v graduiran valj in ga dopolnili s sterilno destilirano vodo do oznake 2 L. Tako pripravljen pufer za elektroforezo smo vlili v elektroforezno komoro ter počakali, da se je ohladil na izbrano temperaturo, pri kateri je tekla elektroforeza (14 °C). Nosilec z agaroznim gelom smo vstavili v elektroforezno banjico, počakali, da se je temperatura gela izenačila s temperaturo pufra, in zagnali elektroforezo.

#### 3.2.1.4.3 Pogoji elektroforeze

Izbrali smo program za ločevanje fragmentov velikosti 25 do 30 kbp. Elektroforeza je potekala 18,5 ur pri temperaturi 14 °C in pri napetosti 6 V/cm ter kotu spremenjanja smeri toka 120°. Začetni in končni pulzni čas sta bila 1 oziroma 17 sekund.

#### 3.2.1.4.4 Barvanje in fotografiranje gela

Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut v raztopini etidijevega bromida, ki smo jo pripravili tako, da smo 300 mL sterilne destilirane vode dodali 5 kapljic etidijevega bromida (1 mg/mL). Nato smo gel približno 15 sekund razbarvali v sterilni destilirani vodi.

Gel smo fotografirali pod UV svetlobo z digitalnim dokumentacijskim sistemom Gel Doc XR in uporabo računalniškega programa Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA).

#### 3.2.1.4.5 Kontrola izvajanja postopkov

Za kontrolo izvajanja postopkov gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju smo uporabili standardni sev *S. aureus* z oznako NCTC 8325.

Liofilizirano kontrolno kulturo seva smo uporabili kot kontrolo celotnega postopka tako priprave agaroznih blokcev kot restrikcije. Že pripravljen kontrolni agarozni blokec je vseboval isti sev bakterije *S. aureus* kot liofilizirana kontrolna kultura in je služil preverjanju postopka restrikcije.

Z uporabo obeh kontrol, tako liofilizirane kontrolne kulture kot že pripravljenega agaroznega blokca z vlopljeno DNA istega seva, smo se lahko prepričali o pravilnem poteku priprave agaroznih blokcev in same restrikcije.

#### 3.2.1.5 Analiza rezultatov

Rezultate smo najprej analizirali po merilih, ki jih je objavil Tenover s sodelavci leta 1995, in nato s pomočjo računalniškega programa Fingerprinting II, verzija 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA).

##### 3.2.1.5.1 Vizualna analiza restrikcijskih vzorcev DNA

Restrikcijske vzorce DNA smo med seboj primerjali v skladu z merili za določanje stopnje sorodnosti, ki jih je objavil Tenover s sodelavci. Seve, ki so vsebovali enako število fragmentov, ki so bili enake velikosti, smo opredelili kot identične oziroma genetsko neločljive. Seve, katerih vzorci fragmentov so se med seboj razlikovali v do treh fragmentih, smo opredelili kot genetsko tesno povezane, tiste, ki so se razlikovali v 4 do 6 fragmentih, pa smo opredelili kot genetsko verjetno povezane. Kot nesorodne oziroma genetsko nepovezane smo seve opredelili, kadar so se njihovi vzorci fragmentov razlikovali v 7 ali več fragmentih (Tenover in sod., 1995).

### 3.2.1.5.2 Analiza restrikcijskih vzorcev DNA s pomočjo računalniškega programa

Stopnjo sorodnosti invazivnih sevov pnevmokokov smo ugotavljali s pomočjo računalniškega programa Fingerprinting II, verzije 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA). Pri vnosu slik gelov v računalniški program smo slednje normalizirali s pomočjo DNA označevalca molekulske mase znane velikosti. Z izračunom koeficienta Dice, ki izraža razmerje med številom skupnih fragmentov in številom vseh fragmentov, smo določili sorodnost med sevi (optimizacija 1 %, toleranca 1 %) in s pomočjo distančne metode neutežne aritmetične sredine (angl. unweighted pair group method using arithmetic averages, UPGMA) oblikovali dendrogram podobnosti analiziranih pnevmokoknih sevov.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ZBIRNA PREGLEDNICA

Rezultate določanja serotipa in odpornosti proti antibiotikom 47 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov smo povzeli po bazi podatkov, ki jo hranijo v Laboratoriju za bakteriologijo Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Centra za nalezljive bolezni IVZ RS. Pregled rezultatov serotipizacije in določanja odpornosti proti antibiotikom, vključno z oznako seva ter datumom izolacije, se nahaja v Prilogi A.

#### 4.1.1 Serotipizacija

Sevi so pripadali serotipom 14, 9V, 6B, 6A, 19F, 19A, 18F, 22F in 24F. Od 47 invazivnih sevov pnevmokokov je serotipu 14 pripadalo 17 sevov, serotipu 9V 11 sevov in serotipu 6B sedem sevov. Ostali serotipi so bili zastopani v manjšem številu in sicer so serotipu 19F pripadali štirje sevi, serotipu 19A trije, serotipu 6A dva in serotipom 18F, 22F in 24F po en sev.

#### 4.1.2 Določanje odpornosti proti antibiotikom

Preglednica 4: Število proti penicilinu, cefotaksimu in ceftriaksonu odpornih invazivnih sevov

Antibiotik	PEN (I)	PEN (R)	CEF (men.) (R)	CEF (nemen.) (R)	CTX (men.) (R)	CTX (nemen.) (R)
Št. sevov	25	22	10	0	2	0

I – vmesno odporni, R – odporni, PEN – penicilin, CEF – cefotaksim, CTX – ceftriakson, men. – meningitični primeri pnevmokoknih bolezni, nemen. – nemeningitični primeri pnevmokoknih bolezni

Iz Preglednice 4 je razvidno, da je bilo od 47 invazivnih sevov 25 (53 %) sevov vmesno odpornih (MIK 0,12 – 1 µg/mL) in 22 (47 %) sevov odpornih proti penicilinu (MIK  $\geq$  2 µg/mL). Podatki o klinični sliki in izidu bolezni bolnikov, pri katerih so bili invazivni sevi osamljeni iz različnih kužnin, so v bazi podatkov zelo pomajnjivi. V primeru, če so bili vsi sevi osamljeni pri bolnikih z meningitisom, je bilo deset (21 %) sevov odpornih proti cefotaksimu in dva (4 %) proti ceftriaksonu, v primeru, če so bili osamljeni pri bolnikih brez meningitisa, pa proti cefotaksimu in ceftriaksonu ni bil odporen noben sev.

Preglednica 5: Število proti eritromicinu, kloramfenikolu, tetraciklinu, vankomicinu, klindamicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom odpornih invazivnih sevov

Antibiotik	ERI	KL	TET	VAN	KLIN	TMP-SMZ
Št. odpornih (R) sevov	13	0	9	0	9	34

R – odporni, ERI – eritromicin, KL – kloramfenikol, TET – tetraciklin, VAN – vankomicin, KLIN – klindamicin, TMP-SMZ – trimetoprim s sulfametoksazolom

Iz Preglednice 5 je razvidno, da je bilo proti eritromicinu odpornih 13 (28 %) sevov, proti klindamicinu in tetraciklinu po devet (19 %) sevov, proti trimetoprimu s sulfametoksazolom pa kar 34, kar predstavlja 72 % vseh analiziranih sevov. Proti kloramfenikolu in vankomicinu ni bil odporen noben sev.

Od analiziranih proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih sevov je bilo hkrati odpornih proti še dvema ali več antibiotikom kar 22 (47 %) sevov. O večkratno odpornih sevih govorimo takrat, kadar so hkrati odporni proti trem ali več različnim razredom antibiotikov. Med preučevanimi invazivnimi sevi je bilo večratno odpornih 13 sevov (28 %). Največ jih je bilo hkrati odpornih ali vmesno odpornih proti penicilinu, eritromicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom, kar je razvidno tudi iz Preglednice 6.

Preglednica 6: Število in delež proti antibiotikom večkratno odpornih invazivnih sevov

Antibiotiki	Št. večkratno odpornih (I + R) sevov	Delež večkratno odpornih (I + R) sevov v %
PEN + ERI + TMP-SMZ	12	26
PEN + ERI + TET + KLIN	9	19
PEN + ERI + TET + KLIN + TMP-SMZ	8	17

I – vmesno odporni, R – odporni, PEN – penicilin, ERI – eritromicin, TET – tetraciklin, KLIN – klindamicin, TMP-SMZ – trimetoprim s sulfametoksazolom

## 4.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA Z METODO PFGE

### 4.2.1 Analiza restrikcijskih vzorcev DNA proti penicilinu odpornih invazivnih sevov, izoliranih v Sloveniji v letu 2004

Želeli smo tipizirati 47 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov. Od tega jih šest na KA ni poraslo. Tako smo tipizirali 41 sevov. Na istih gelih smo analizirali seve po sklopih serotipa 9V in 14 skupaj, serotipa 6A in 6B skupaj ter serotipe 19F, 19A, 18F, 22F in 24F skupaj.

Restriktijska vzorca DNA liofilizirane kontrolne kulture standardnega seva *S. aureus* z oznako NCTC 8325 obeh kontrol sta bila identična. Tako lahko trdimo, da sta priprava agaroznih blokcev in sam postopek restrikcije potekala pravilno.

Restriktijske vzorce DNA smo med seboj vizualno primerjali in ugotovili, da so najbolj podobni restriktijski vzorci sevov serotipov 9V in 14 ter 6A in 6B, med katerimi so bili nekateri identični. Najbolj različne restriktijske vzorce DNA so imeli sevi serotipov 19F, 19A, 18F, 22F in 24F.

Glede na dobljene restriktijske vzorce DNA sevov smo v mednarodni molekularno-epidemiološki mreži proti antibiotikom odpornih klonov bakterije *S. pneumoniae*, imenovani PMEN (angl. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network), poiskali sedem predstavnikov mednarodnih odpornih klonov, dostopnih v javni zbirki ATCC, s čim bolj podobnimi restriktijskimi vzorci. Tako smo 41 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov še enkrat analizirali skupaj s predstavniki mednarodnih večkratno odpornih klonov, ter tokrat njihove restriktijske vzorce DNA bolj podrobno analizirali in jih primerjali po merilih, ki jih je Tenover objavil s sod. (1995), in s pomočjo računalniškega programa, ki je izrisal dendrograme s katerimi smo podobnost med sevi in mednarodnimi kloni lahko tudi slikovno prikazali.

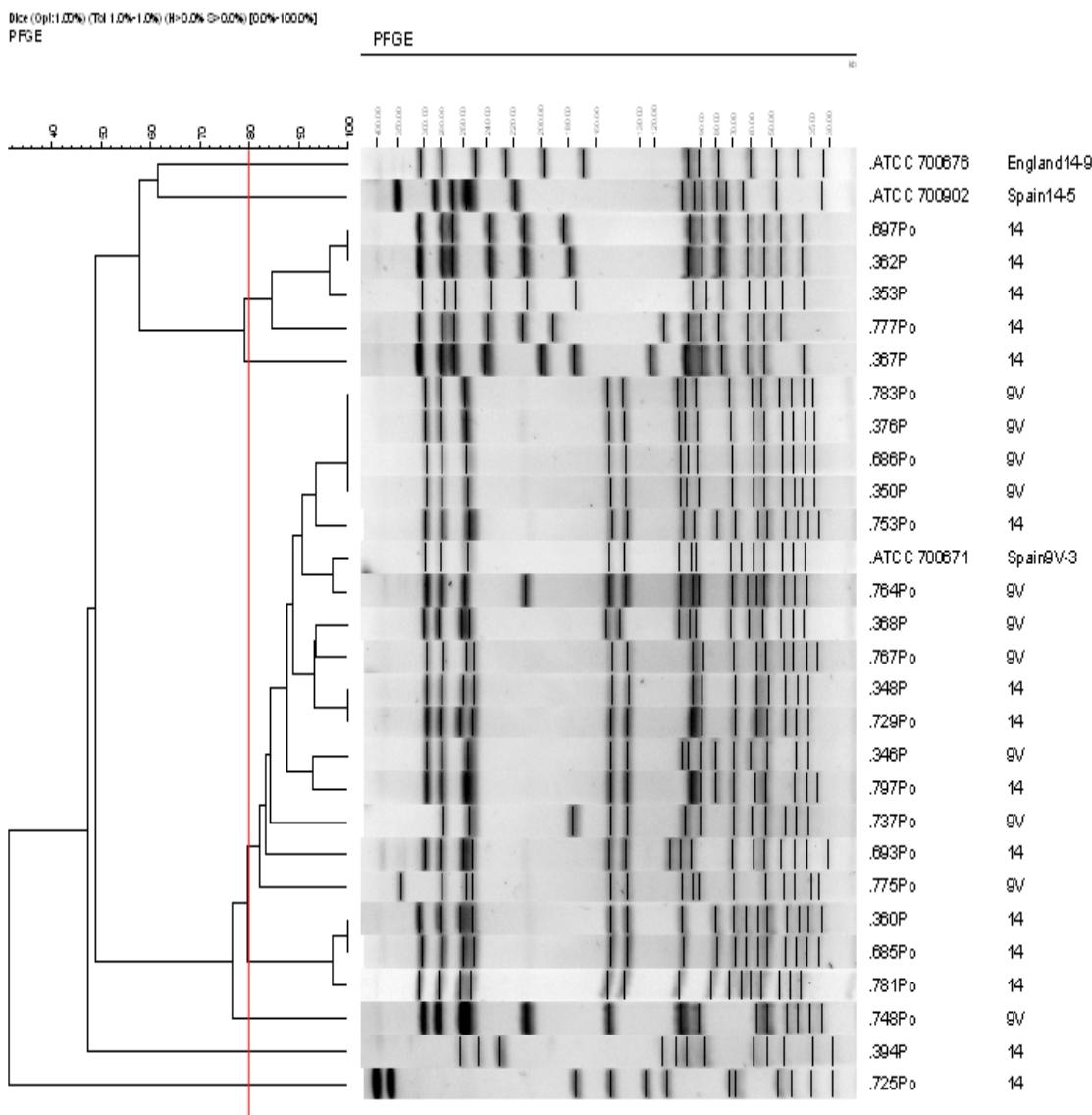
#### **4.2.2 Analiza podobnosti restriktijskih vzorcev DNA med sevi, izoliranimi v Sloveniji v letu 2004, in izbranimi predstavniki mednarodnih odpornih klonov iz zbirke ATCC**

Restriktijske vzorce DNA 41 invazivnih sevov in sedmih mednarodnih odpornih klonov smo podrobno analizirali in jih primerjali po merilih, ki jih je objavil Tenover s sod. (1995), ter s pomočjo računalniškega programa.

Na dendrogramu podobnosti vsaka točka razvejitve predstavlja vrednost Dice-ovega koeficiente podobnosti za par posameznih sevov in njemu najbolj podobnega seva, za par sev – skupina sevov ali pare skupin sevov. Pri izračunu Dice-ovega koeficiente je program upošteval 1%- optimizacijo in 1%- toleranco.

#### 4.2.2.1 Analiza podobnosti med sevi serotipov 14, 9V ter predstavniki klonov England<sup>14-9</sup>, Spain<sup>14-5</sup> in Spain<sup>9V-3</sup>

Računalniška analiza podobnosti sevov serotipov 14 in 9V ter predstavnikov klonov England<sup>14-9</sup>, Spain<sup>14-5</sup> in Spain<sup>9V-3</sup> je prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 14 in 9V ter predstavnikov klonov England<sup>14-9</sup>, Spain<sup>14-5</sup> in Spain<sup>9V-3</sup>

V Preglednici 6 prikazujemo stopnjo podobnosti, dobljeno z analizo slik gelov, na katerih smo skupaj tipizirali seve serotipeov 14, 9V ter predstavnike klonov Spain<sup>9V-3</sup>, Spain<sup>14-5</sup>, England<sup>14-9</sup> in število fragmentov, v katerih se ti sevi razlikujejo od primerjanih klonov.

Preglednica 7: Analiza podobnosti med sevi serotipa 14, 9V ter predstavniki klonov Spain<sup>9V</sup>-3, Spain<sup>14</sup>-5 in England<sup>14</sup>-9

Oznaka seva	Serotip	Spain <sup>9V</sup> -3		Spain <sup>14</sup> -5		England <sup>14</sup> -9	
		Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %	Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %	Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %
764Po	9V	<b>1</b> (3)	<b>96,8</b>	> 7	48,3	> 7	34,5
350P	9V	<b>3</b> (4)	<b>93,3</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
686Po	9V	<b>3</b> (4)	<b>93,3</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
783Po	9V	<b>3</b> (4)	<b>93,3</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
368P	9V	<b>3</b>	<b>93,3</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
376P	9V	<b>3</b> (4)	<b>93,3</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
348P	14	<b>3</b>	<b>89,7</b>	> 7	51,9	> 7	51,9
346P	9V	<b>3</b> (5)	<b>89,7</b>	> 7	44,4	> 7	44,4
729Po	14	<b>3</b>	<b>89,7</b>	> 7	51,9	> 7	51,9
753Po	14	<b>4</b>	<b>86,7</b>	> 7	42,9	> 7	42,9
767Po	9V	<b>4</b>	<b>86,7</b>	> 7	50,0	> 7	50,0
781Po	14	<b>4</b>	<b>86,7</b>	> 7	42,9	> 7	50,0
737Po	9V	<b>4</b>	<b>85,7</b>	> 7	46,2	> 7	46,2
685Po	14	<b>5</b>	<b>83,9</b>	> 7	41,4	> 7	48,3
693Po	14	<b>5</b>	<b>83,9</b>	> 7	48,3	> 7	48,3
360P	14	<b>5</b>	<b>83,9</b>	> 7	41,4	> 7	48,3
797Po	14	<b>5</b>	<b>82,8</b>	> 7	44,4	> 7	44,4
775Po	9V	<b>6</b>	<b>80,0</b>	> 7	50,0	> 7	42,9
748Po	9V	<b>7</b>	<b>75,9</b>	> 7	51,9	> 7	44,4
367P	14	> 7	50,0	> 7	46,2	> 7	46,2
353P	14	> 7	50,0	> 7	46,2	> 7	53,8
697Po	14	> 7	50,0	> 7	53,8	> 7	61,5
362P	14	> 7	50,0	> 7	53,8	> 7	61,5
394P	14	> 7	50,0	> 7	48,0	> 7	40,0
777Po	14	> 7	42,9	> 7	53,8	> 7	53,8
725Po	14	> 7	37,0	> 7	32,0	> 7	32,0

Iz Slike 8 in Preglednice 6 je razvidno, da najvišjo stopnjo podobnosti z mednarodnim odpornim klonom Spain<sup>9V</sup>-3 kaže osem sevov serotipa 14 in deset sevov serotipa 9V. Njim podoben je tudi en sev serotipa 9V, vendar ga glede na sedem različnih fragmentov opredelimo kot nesorodnega s tem klonskim kompleksom.

Vrednosti Dice-ovega koeficiente podobnosti, ki jih je izračunal program, so zaradi analize slik dveh gelov ter 1%- optimizacije in tolerance pri nekaterih sevih nižje ali višje, kot bi bile pri izračunu Dice-ovega koeficiente iz vizualne analize restriktijskih profilov in posledično višjega ali nižjega določenega števila različnih fragmentov. Kljub temu je

podobnost osmih sevov serotipa 14 in desetih serotipa 9V klonu Spain<sup>9V</sup>-3 večja ali enaka 80 %, zato jih lahko opredelimo kot genetsko tesno povezane ali vsaj povezane s tem klonom.

Iz Slike 8 vidimo, da veliko stopnjo podobnosti kaže tudi pet sevov serotipa 14, vendar niso sorodni klonu Spain<sup>9V</sup>-3. Dva seva serotipa 14 nista sorodna nobenemu izmed tipiziranih sevov serotipov 14 in 9V. Prav tako ti in vsi preostali tipizirani sevi serotipov 14 in 9V niso sorodni klonoma England<sup>14</sup>-9 in Spain<sup>14</sup>-5, saj so vrednosti Dice-ovega koeficiente podobnosti manjše od 80 % in je število fragmentov, v katerih se njihovi restriktijski vzorci DNA razlikujejo, večje od sedem.

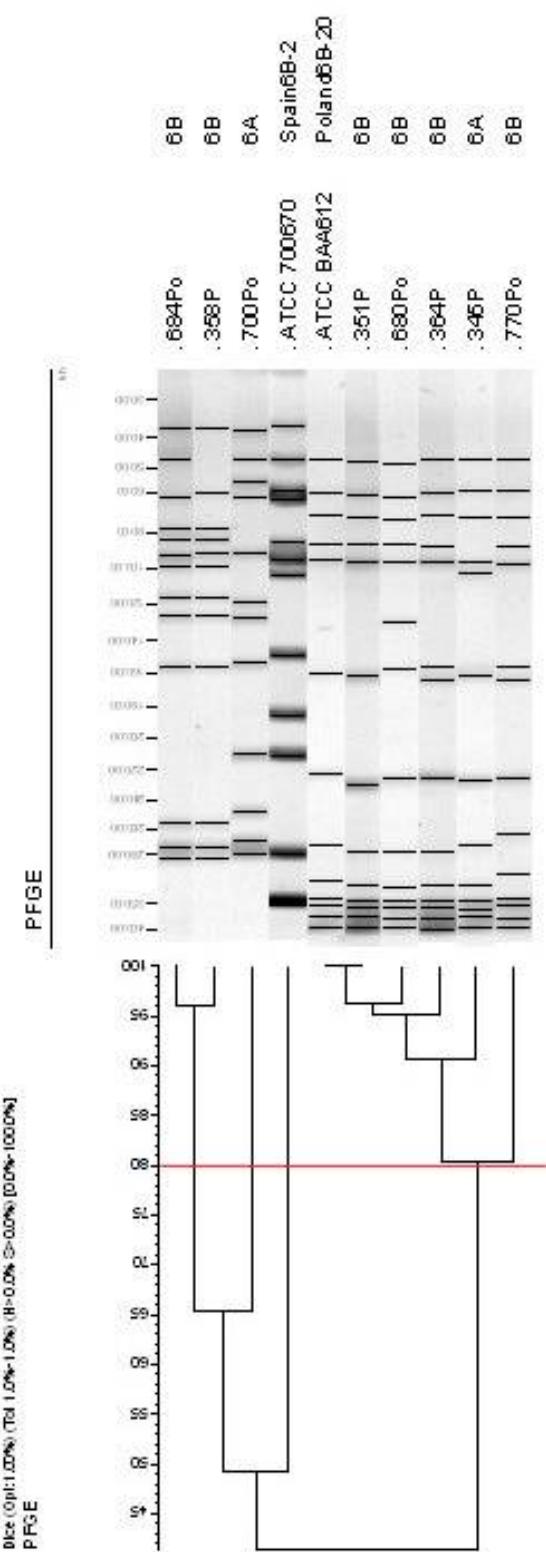
#### 4.2.2.2 Analiza podobnosti med sevi serotipov 6A, 6B ter predstavnikoma klonov Spain<sup>6B</sup>-2 in Poland<sup>6B</sup>-20

V Preglednici 7 prikazujemo stopnjo podobnosti, dobljeno z analizo slike gela, na katerem smo skupaj tipizirali serotipa 6A, 6B ter predstavnika klonov Spain<sup>6B</sup>-2 in Poland<sup>6B</sup>-20 in število fragmentov, v katerih se ti sevi razlikujejo od primerjanih klonov.

Preglednica 8: Analiza podobnosti med sevi serotipa 6A, 6B ter predstavnikoma klonov Spain<sup>6B</sup>-2 in Poland<sup>6B</sup>-20

Oznaka seva	Serotip	Poland <sup>6B</sup> -20		Spain <sup>6B</sup> -2	
		Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %	Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %
684Po	6B	> 7	38,5	> 7	56,0
358P	6B	> 7	40,0	> 7	41,7
700Po	6A	> 7	40,0	> 7	50,0
351P	6B	<b>0</b>	<b>100,0</b>	> 7	48,0
680Po	6B	<b>1</b>	<b>96,3</b>	> 7	46,2
364P	6B	<b>1</b>	<b>96,3</b>	> 7	46,2
345P	6A	<b>2</b>	<b>92,3</b>	> 7	48,0
770Po	6B	<b>5</b>	<b>81,5</b>	> 7	38,5

Računalniška analiza podobnosti sevov serotipov 6A in 6B ter predstavnikov klonov Spain<sup>6B</sup>-2 in Poland<sup>6B</sup>-20, je prikazana na Sliki 9.



Slika 9: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 6A, 6B in predstavnikov klonov Spain<sup>6B-2</sup> in Poland<sup>6B-20</sup>

Kot je razvidno iz Slike 9 in Preglednice 7, so glede na vrednosti Dice-ovega koeficiente restrikcijskemu vzorcu DNA mednarodnega večkratno odpornega klena Poland<sup>6B</sup>-20 najbolj podobni vzorci štirih sevov serotipa 6B in enega seva serotipa 6A.

Sev z oznako 351P in klen Poland<sup>6B</sup>-20 sta genetsko neločljiva oziroma identična, ostale seve serotipov 6B in 6A z več kot 90 % stopnjo podobnosti in razliko v enem do dveh fragmentih lahko opredelimo kot genetsko tesno povezane. Sev serotipa 6B in klen Poland<sup>6B</sup>-20 lahko glede na več kot 80 % stopnjo podobnosti in zaradi prisotnosti petih različnih fragmentov opredelimo kot vsaj genetsko verjetno povezana.

Genetsko tesno povezana sta še dva seva serotipa 6B, saj se njuna vzorca razlikujeta le v enem fragmentu, vendar nista sorodna klonu Poland<sup>6B</sup>-20.

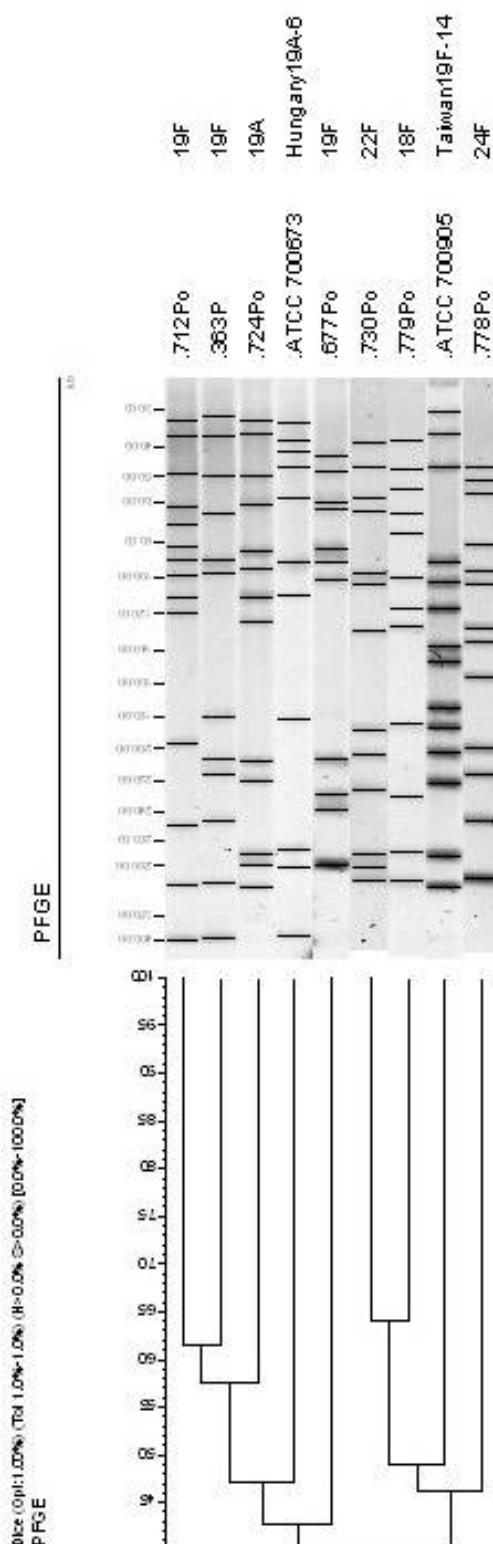
Na Sliki 9 vidimo, da vzorec nobenega izmed osmih tipiziranih sevov serotipov 6A in 6B ni podoben restrikcijskemu vzorcu klena Spain<sup>6B</sup>-2. Glede na vrednosti Dice-ovega koeficiente podobnosti manj kot 60 % in več kot sedem različnih fragmentov lahko vse tipizirane seve serotipov 6A in 6B opredelimo kot genetsko nepovezane s klonom Spain<sup>6B</sup>-2.

#### 4.2.2.3 Analiza podobnosti med sevi serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F ter predstavnikoma klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A</sup>-6

Preglednica 9: Analiza podobnosti med sevi serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F ter predstavnikoma klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A</sup>-6

Oznaka seva	Serotip	Taiwan <sup>19F</sup> -14		Hungary <sup>19A</sup> -6	
		Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %	Št. različnih fragmentov	Dice-ov koeficient v %
712Po	19F	> 7	42,9	> 7	48,0
363P	19F	> 7	46,2	> 7	43,5
724Po	19A	> 7	51,9	> 7	50,0
677Po	19F	> 7	40,0	> 7	45,5
730Po	22F	> 7	51,9	> 7	41,7
779Po	18F	> 7	46,2	> 7	34,8
778Po	24F	> 7	44,4	> 7	16,7

V Preglednici 8 prikazujemo stopnjo podobnosti, dobljeno z analizo slike gela, na katerem smo skupaj tipizirali seve serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F ter predstavnika klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A</sup>-6 in število fragmentov, v katerih se ti sevi razlikujejo od primerjanih klonov.



Slika 10: Dendrogram podobnosti sevov serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F in predstavnikov klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A-6</sup>

Računalniška analiza podobnosti serotipov 19A, 18F, 19F, 22F, 24F in klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A</sup>-6 je prikazana na Sliki 10.

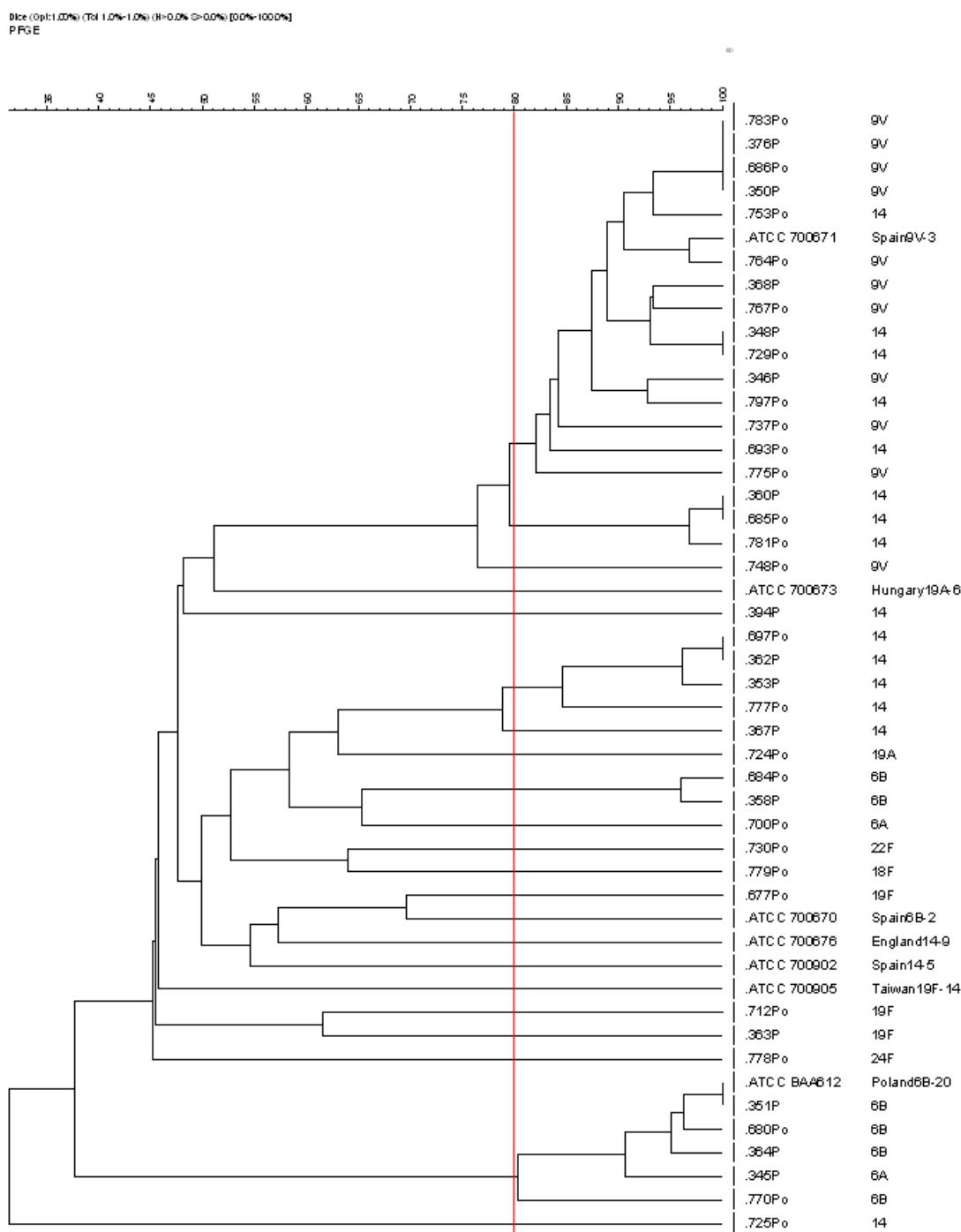
Vidimo, da so vrednosti Dice-ovega koeficienta podobnosti v Preglednici 8 precej nižje od 80 %. Vsi sevi serotipov 19A, 18F, 19F, 22F in 24F so po Tenover-jevih merilih (Tenover in sod., 2005) genetsko nepovezani in niso sorodni nobenemu izmed mednarodnih večkratno odpornih klonov Taiwan<sup>19F</sup>-14 in Hungary<sup>19A</sup>-6, saj se njihovi vzorci razlikujejo v več kot sedmih fragmentih, kar je razvidno iz Slike 10.

#### 4.2.2.4 Analiza dendrograma vseh tipiziranih sevov in predstnikov mednarodnih odpornih klonov

Dendrogram, ki ga sestavljajo vsi tipizirani sevi in predstavniki mednarodnih odpornih klonov, je prikazan na Sliki 11.

Kot je razvidno iz Slike 11, so se v dendrogramu vseh tipiziranih sevov oblikovale tri gruče (klastri), sestavljene iz vsaj treh sevov. V prvi je osem sevov serotipa 14 in deset serotipa 9V sorodnih mednarodnemu odpornemu klonu Spain<sup>9V</sup>-3. V drugi je med seboj sorodnih pet sevov serotipa 14 in v tretji so širje sevi serotipa 6B in en serotipa 6A sorodni mednarodnemu večkratno odpornemu klonu Poland<sup>6B</sup>-20.

Vrednosti Dice-ovega koeficienta na razvejiščih dendrograma so zaradi medsebojne primerjave več gelov nekoliko nižje.



Slika 11: Dendrogram podobnosti vseh proti penicilinu odpornih invazivnih sevov in predstavnikov mednarodnih odpornih klonov pnevmokokov, tipiziranih z metodo PFGE

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo z molekularno tipizacijsko metodo PFGE žeeli opredeliti pojav velikega porasta proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov v Sloveniji v letu 2004. Delež sevov z zmanjšano občutljivostjo se je iz 17,3 % v letu 2003 v tem letu namreč povzpel na kar 27,5 %.

V letu 2004 je bilo mikrobiološko potrjenih 171 primerov invazivnih pnevmokoknih obolenj (incidenca na 100.000 je znašala 8,6). Od teh je bilo 137 primerov pri odraslih in 34 primerov pri otrocih, mlajših od 14 let. Umrlo je sedem odraslih oseb (Epidemiološko ..., 2005).

Za invazivne pnevmokokne seve je značilna osamitev bakterije *S. pneumoniae* iz primarno sterilnih mest. Najpogostejsa kužnina, iz katere je bil osamljen pnevmokok, je bila kri (40 primerov).

V okviru rednega dela v laboratoriju Oddelka za medicinsko mikrobiologijo IVZ RS so vsem sevom potrdili identifikacijo, določili serotip in odpornost proti antibiotikom. Ugotovili so, da je bilo vmesno odpornih in odpornih proti penicilinu 47 invazivnih sevov, ki smo jih v okviru diplomskega dela skupaj z izbranimi predstavniki mednarodnih klonov z metodo PFGE podrobnejše analizirali.

Med analiziranimi proti penicilinu vmesno odpornimi in odpornimi invazivnimi sevi je bilo pri odraslih bolnikih izoliranih 31 in pri otrocih 16 sevov, kar kaže na več kot dvakrat večji delež proti penicilinu odpornih sevov pri otrocih (47,1 %) kot pri odraslih (22,6 %). Pri otrocih je delež proti antibiotikom odpornih sevov pnevmokokov večji, ker so pnevmokoki pri njih pogosteje in dalj časa kot pri odraslih del normalne mikrobne flore nosno-žrelne sluznice. Otroci so tudi pogosteje izpostavljeni različnim protimikrobnim zdravilom, kar poveča možnost za nosilstvo in razvoj okužbe z odpornim sevom (Jacobs, 2004; Dagan in Klugman, 2008). Pnevmočoki, ki so bili v Sloveniji pri otrocih izolirani v letih 2002 do 2005, so imeli v povprečju skoraj dvakrat večje deleže odpornosti proti različnim antibiotikom kot tisti, izolirani pri odraslih (Paragi in sod., 2006). O

prevladovanju odpornejših in tudi večkratno odpornih sevov pri otrocih poročajo tudi drugi avtorji (McGee in sod., 2001).

### **5.1.1 Serotipizacija**

Za svetovno širjenje odpornosti proti penicilinu med pnevmokoki je večinoma odgovorna razširitev manjšega števila uspešnih opornih klonov (McGee in sod., 2001), katerih širjenje dokazuje tudi to, da med odpornimi sevi prevladuje le nekaj serotipov. Z določanjem serotipa proti penicilinu odpornih invazivnih sevov smo pokazali, da je bilo med analiziranimi sevi največ sevov serotipa 14 (36 %), sledili so sevi serotipov 9V (23 %), 6B (15 %), 19F (9 %) in 19A (6 %). Torej je bilo med analiziranimi sevi največ serotipov, ki najpogosteje povzročajo invazivna obolenja pri otrocih. Ostali serotipi so predstavljeni manjše deleže. Sevi serotipov 14 in 9V so skupaj predstavljali več kot polovico (59 %) vseh analiziranih sevov. Ta dva serotipa sta glede na rezultate študij o invazivnih pnevmkoknih boleznih med najbolj razširjenimi tudi v nekaterih drugih državah (Bennett in sod., 2003; Sjöström in sod., 2007).

Znano je, da je pojavljanje odpornosti pnevmokokov proti penicilinu in posledično invazivnih pnevmkoknih okužb z odpornimi sevi v glavnem povezano s sedmimi serotipi, ki pogosteje naseljujejo nosno-žrelni prostor otrok: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F in 23F (Dagan in Klugman, 2008). Rezultati serotipizacije tako niso presenetljivi, saj 94 % analiziranih sevov pripada šestim izmed teh sedmih serotipov.

### **5.1.2 Določanje odpornosti proti antibiotikom**

Odpornost pnevmkoknih sevov proti antibiotikom, ki lahko povzroči neuspešno zdravljenje pnevmkoknih okužb, je opredeljena z določanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika, ki prepreči rast pnevmokokov. Mejne vrednosti so MIK-i, ki opredeljujejo seve kot občutljive (S - sensitive), vmesno odporne (I - intermediate) in odporne (R - resistant) proti določenim antibiotikom (CDC, 2008). Odpornost analiziranih pnevmkoknih sevov proti antibiotikom so na IVZ RS določili v skladu s standardi CLSI, veljavnimi leta 2004, po katerih MIK za penicilin  $\leq 0,06 \mu\text{g}/\text{mL}$  določa občutljive seve, MIK  $0,12 - 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  vmesno odporne seve in MIK  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  odporne seve (NCCLS, 2004). Januarja leta 2008 pa so za *S. pneumoniae* začele pri CLSI veljati nove mejne

vrednosti MIK za penicilin, ki določajo odpornost za nemenengitične in meningitične primere pnevmokoknih bolezni (CLSI, 2008).

Mejne vrednosti za penicilin, ki so veljale pred letom 2008, so temeljile na koncentracijah penicilina, ki bi jih lahko dosegli v cerebrospinalni tekočini (likvorju), in na MIK, potrebnii za uspešno zdravljenje. Postavitve novih mejnih vrednosti so posledica rezultatov več opravljenih študij, ki so dokazale, da je bilo mogoče z večjimi odmerki uspešno ozdraviti bolnika s pnevmokokno okužbo, tudi kadar so sevi pokazali zmanjšano občutljivost za penicilin »in vitro« (CLSI, 2008). Z novimi mejnimi vrednostmi se bo zmanjšalo število proti penicilinu odpornih nemenengitičnih sevov, kar kažejo tudi rezultati študij, opravljenih v Nemčiji (Imöhl in sod., 2009) in ZDA (CDC, 2008). S tem se bo povečala možnost uporabe penicilina za zdravljenje nemenengitičnih pnevmokoknih okužb namesto uporabe antibiotikov s širokim spektrom delovanja. Nove mejne vrednosti so predvsem pomembne za klinično uporabo penicilina. V času izvajanja laboratorijskega dela v okviru diplomskega dela so bile za javnozdravstveno informatiko še vedno pomembne stare mejne vrednosti (NCCLS, 2004), zato smo te vrednosti, tudi zaradi primerjav podatkov z drugimi državami, upoštevali pri interpretaciji določanja odpornosti proti antibiotikom.

Za pnevmokokne seve, odporne proti penicilinu, je značilno, da so pogosteje odporni tudi proti drugim antibiotikom (Cartwright, 2002), kar dokazujejo tudi rezultati naše raziskave, opravljene v okviru diplomskega dela, saj je bilo od vseh testiranih proti penicilinu odpornih invazivnih sevov kar 72 % odpornih tudi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom, 28 % proti eritromicinu in 19 % proti tetraciklinu in klindamicinu.

Sjöström (2007) je v svoji raziskavi preučevala seve z zmanjšano občutljivostjo za penicilin na Švedskem med letoma 1997 in 2003 in prav tako ugotovila visok delež sevov, ki so bili odporni tudi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom. Med vsemi testiranimi sevi z zmanjšano občutljivostjo za penicilin na Švedskem med letoma 1997 in 2003 je bilo kar 82 % odpornih tudi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom, 32 % proti tetraciklinu in 26 % proti eritromicinu.

Po standardih CLSI (NCCLS, 2004) veljajo za cefotaksim in ceftriaxon mejne vrednosti MIK, ki določajo občutljive in manj občutljive seve za nemenengitične in meningitične primere pnevmokoknih bolezni. V letu 2004 je bilo v Sloveniji prijavljenih 54 primerov

gnojnega bakterijskega meningitisa. Pri 21 bolnikih povzročitelj ni bil izoliran, pri 14 obolelih je gnojno vnetje povzročila bakterija *S. pneumoniae* (Epidemiološko ..., 2005). Žal so podatki o klinični sliki in izhodu bolezni bolnikov, pri katerih so bili osamljeni proti penicilinu odporni invazivni sevi pnevmokokov, preučevani v okviru našega diplomskega dela, v bazi podatkov zelo pomanjkljivi, kar opozarja na pomembnost dobrih podatkovnih zbirk za raziskave. Tako lahko rezultate interpretiramo le na način, da predpostavimo, da so bili vsi sevi osamljeni pri bolnikih z meningitisom (precenimo dejansko stanje) ali pri bolnikih brez meningitisa (podcenimo dejansko stanje). V primeru, če bi šlo pri vseh osamljenih sevih za meningitične primere pnevmokoknih bolezni, je bilo poleg vmesno odpornih in odpornih proti penicilinu 21 % sevov odpornih tudi proti cefotaksimu in 4 % proti ceftriaksonu.

Med vsemi testiranimi pnevmokoknimi sevi nismo zaznali odpornosti proti kloramfenikolu ali vankomicinu. Do danes tudi še niso odkrili pnevmokoknih sevov, ki bi bili odporni proti vankomicinu. Kljub temu je pomembno spremljanje občutljivosti za vankomicin, saj so že poročali vmesno odpornih sevih, ki bi lahko hitro razvili odpornost (Jacobs, 2004).

Poznavanje antibiotične občutljivosti krožečih sevov je pomembno zaradi določanja priporočil za zdravljenje pnevmokoknih bolezni. Pojav proti penicilinu odpornih in zlasti večkratno odpornih sevov pnevmokokov je v zadnjih desetletjih postal velikega svetovnega javnozdravstvenega pomena, saj otežuje zdravljenje, še posebej pri vnetju možganskih ovojnic, in povečuje tveganje za smrtni izid bolezni (Sjöström in sod., 2007). Kot večkratno odporne seve pnevmokokov pojmujemo seve, ki so odporni proti trem ali več različnim razredom antibiotikov hkrati, običajno proti penicilinu, tetraciklinu, eritromicinu, klindamicinu, trimetoprimu s sulfametoksazolom in kloramfenikolu (Appelbaum, 2002). Med analiziranimi invazivnimi sevi pnevmokokov je bila več kot četrtina (28 %) sevov večkratno odpornih. Največ jih je bilo hkrati odpornih ali vmesno odpornih proti penicilinu, eritromicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom.

Številne raziskave dokazujejo povezanost uporabe antibiotikov z razvojem odpornih in večkratno odpornih bakterijskih sevov. V evropskih državah so deleži odpornih sevov pnevmokokov različni, saj so povezani z različno porabo antibiotikov (Riedel in sod., 2007; Isaacman in sod., 2009). Podatki letnega poročila EARSS (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance System) za leto 2007 kažejo na najmanjši delež

(pod 5 %) proti penicilinu odpornih invazivnih sevov v večini severnoevropskih držav (Velika Britanija, Norveška, Švedska, Nizozemska, Nemčija ...), kar se ujema z nižjo porabo antibiotikov in večjo javnozdravstveno ozaveščenostjo predpisovanja antibiotikov v teh državah. O visoki ravni (nad 25 %) proti penicilinu odpornih invazivnih sevov so poročali predvsem iz Poljske in nekaterih držav južne in zahodne Evrope (Francija, Romunija, Turčija ...), kjer se antibiotiki predpisujejo pogosteje (EARSS ..., 2008). Kljub temu, da je antibiotična izpostavljenost najpomembnejši dejavnik tveganja za pojav proti antibiotikom odpornih pnevmokoknih sevov (Jacobs, 2004; Dagan in Klugman, 2008), in da večja poraba antibiotikov glede na opravljene raziskave povzroča višji delež odpornih sevov (Riedel in sod., 2007), pa nekatere raziskave opisujejo naraščanje deleža odpornih sevov pnevmokokov kljub zmanjšani porabi antibiotikov. Raziskava, ki so jo opravili Sjöström in sod. (2007) na Švedskem, je pokazala večjo razširjenost večkratno odpornih sevov kljub zmanjšani porabi antibiotikov med letoma 1997 in 2003.

V Sloveniji je poraba antibiotikov še do leta 1999 naraščala, nato se je v šestih letih zmanjšala skoraj za petino in se leta 2007 ponovno povečala (Knaps, 2007). Delež invazivnih sevov z zmanjšano občutljivostjo za penicilin se je leta 2004 v Sloveniji povzpel na kar 27,5 %, kar Slovenijo v Evropi v letu 2004 glede na letno poročilo EARSS (2005) uvršča med države z najvišjim deležem proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih izolatov.

Delež proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov se je tako v letu 2004 močno povečal kljub zmanjšani porabi antibiotikov v Sloveniji med letoma 2000 in 2006, že leta 2005 pa je padel (Preglednica 1), zato smo z že vpeljano metodo PFGE analizirali in med seboj primerjali restrikcijske profile 41 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov, izoliranih v Sloveniji v letu 2004, in sedem izbranih predstavnikov mednarodnih odpornih klonov pnevmokokov, opisanih v mednarodni molekularno-epidemiološki mreži PMEN. Želeli smo namreč ugotoviti, ali so ti proti penicilinu odporni invazivni sevi pnevmokokov med seboj genetsko sorodni, ali so sorodni kateremu izmed predstavnikov mednarodnih odpornih klonov in ali morda pripadajo klonskemu kompleksu, katerega razširitev bi lahko bila odgovorna za porast števila proti penicilinu odpornih sevov pnevmokokov v Sloveniji leta 2004.

### 5.1.3 Molekularna tipizacija z metodo PFGE

Seve pnevmokokov lahko razlikujemo s serotipizacijo, ki je tradicionalna fenotipska metoda (Shaaly in sod., 2005), vendar imajo sevi pnevmokokov istega serotipa lahko različen restriktijski vzorec DNA in obratno (Sjöström, 2007). Zato danes za spremljanje in preučevanje klonalne povezanosti odpornih sevov pnevmokokov in prisotnosti mednarodnih odpornih klonov serotipizacija kot fenotipska metoda ni dovolj in je izrednega pomena uporaba molekularnih tipizacijskih metod, s katerimi lahko določimo medsebojno podobnost oz. sorodnost med sevi.

Z metodo PFGE, ki je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko sposobnostjo ločevanja (Singh in sod., 2006), smo od preučevanih 47 proti penicilinu odpornih invazivnih sevov tipizirali 41 sevov.

Rezultati molekularne tipizacije so pokazali, da je večina sevov serotipov 14 in 9V (44 % vseh uspešno tipiziranih sevov) pripadala istemu klonskemu kompleksu kot mednarodno razširjeni odporni klon pnevmokokov Spain<sup>9V</sup>-3. Klon serotipa 9V Spain<sup>9V</sup>-3 je bil, odkar so ga prvič opisali v Španiji in Franciji, podrobno preučevan v okviru številnih raziskav (McGee in sod, 2001; Sjöström in sod., 2007). Predstavlja enega izmed najuspešnejših klonov pnevmokokov z zmanjšano občutljivostjo za penicilin in trimetoprim s sulfametoksazolom in je danes široko razširjen po vsem svetu. Za pnevmokoke je značilna zmožnost preklopa tipa kapsule (Pletz in sod., 2007) in v številnih državah so poročali o različicah serotipov 14, 9A in serološke skupine 19 tega klena. Med najpogostejšimi različicami klena Spain<sup>9V</sup>-3 pa je prav serotip 14 (McGee in sod., 2001), kar kažejo tudi rezultati naše raziskave. Razlogi za uspešno širjenje posameznih klonov še niso dobro poznani. Odporni kloni se širijo tudi kljub zmanjšani porabi antibiotikov, selekcija teh klonov bi torej lahko bila posledica dejavnikov, drugačnih od tistih povezanih z odpornostjo proti antibiotikom. Uspešno širjenje klena Spain<sup>9V</sup>-3 so pripisovali njegovi multirezistentni naravi, vendar so Sjöström in sod. (2007) v svoji raziskavi z analizo z mikroploščami pri tem klonu odkrili izražanje pilusov, ki bi lahko prispevalo k svetovnemu širjenju Spain<sup>9V</sup>-3 in drugih uspešnih za penicilin neobčutljivih klonov s pilusi.

Ugotovili smo tudi, da so štirje sevi serotipa 6B in en sev serotipa 6A pripadali istemu klonu ali klonskemu kompleksu kot mednarodno razširjeni klon Poland<sup>6B</sup>-20. Sevu serotipa 6A smo po pridobljenih rezultatih molekularne analize ponovno določili serotip in ugotovili, da je bil le-ta pravilno določen. Za pripadnost seva serotipa 6A klonskemu kompleksu Poland<sup>6B</sup>-20 je tako verjetno odgovoren znan pojav preklopa tipa kapsule, kljub temu, da pri teh serotipih ni tako običajen kot pri 14 in 9V. Vsi sevi, ki so pripadali klonskemu kompleksu Poland<sup>6B</sup>-20, so imeli poleg odpornosti proti penicilinu, izraženo tudi odpornost proti eritromicinu, tetraciklinu, klindamicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom. S tem smo v Sloveniji v letu 2004 potrdili prisotnost še enega mednarodnega večkratno odpornega uspešnega klonskega kompleksa pnevmokokov. Za proti penicilinu vmesno odporne in odporne seve pnevmokokov je značilna visoka stopnja klonalnosti (Sadowy in sod., 2007) in iz dobljenih rezultatov tako lahko sklepamo o klonalnosti izoliranih pnevmokokov tudi v Sloveniji.

Restriktijski vzorci DNA sevov serotipov 19F, 19A, 18F, 22F in 24F so se med seboj močno razlikovali. Glavni razlog za porast odpornosti proti penicilinu med invazivnimi pnevmokoknimi sevi v Sloveniji v letu 2004 je bila razširitev klonskega kompleksa mednarodno razširjenega odpornega klena Spain<sup>9V</sup>-3. Večina sevov, ki je pripadala temu klonskemu kompleksu, je imela poleg odpornosti proti penicilinu izraženo tudi visoko stopnjo odpornosti proti trimetoprimu s sulfametoksazolom, kar je značilno tudi za mednarodno razširjeni odporni klen Spain<sup>9V</sup>-3.

Seve, ki so pripadali klonskemu kompleksu Spain<sup>9V</sup>-3, bi bilo zanimivo analizirati z metodo MLST, da bi ugotovili, ali pripadajo istemu sekvenčnemu tipu

Vse pogostejsa odpornost pnevmokokov proti penicilinu je zaskrbljujoča ne le zaradi učinka, ki ga lahko ima na njegovo klinično uporabo, ampak tudi zato, ker je odpornost pnevmokokov proti penicilinu dokazano povezana z odpornostjo tudi proti drugim antibiotikom, in ker se večkratno odporni sevi širijo klonalno. Za razvoj in širjenje odpornosti pri pnevmokokih je tako bistvenega pomena selekcijski pritisk, ki ga ustvarjata antibiotična terapija in klonalno širjenje odpornih sevov. Za zmanjšanje deleža odpornih sevov in obvladovanje širjenja odpornosti je bistveno zmanjšati porabo antibiotikov, povečati precepljenost in z uporabo molekularne diagnostike poskušati razumeti načine širjenja in spremljati prisotnost mednarodnih večkratno odpornih klonov.

Ker se odporni kloni pnevmokokov širijo tudi kljub celotni zmanjšani uporabi antibiotikov, je potrebno opozoriti na pomembno vlogo cepljenja, ki vpliva na znižanje pojavljanja odpornih sevov in znižuje število nosilcev ter s tem omejuje širjenje pnevmokokov.

Narava uspešnega širjenja klonov in njihova dinamika za vse vrste bakterij v svetu znanosti za zdaj ostaja uganka. Rezultati analiz, pri katerih informacije molekularno-epidemioloških študij kliničnih sevov lahko kombiniramo s kliničnimi podatki okuženih bolnikov, bi nam v prihodnosti lahko pomagali razumeti, zakaj se nekateri bakterijski kloni uspešno širijo, medtem ko drugi izginjajo. Sčasoma bi tako lahko uvedli boljše strategije za preprečevanje širjenja mednarodnih odpornih klonov v svetovni populaciji, med katerimi se trenutno zdi najboljša uporaba cepiva s kombinacijo več beljakovinskih antigenov.

## 5.2 SKLEPI

- Za pojav porasta odpornosti proti penicilinu v Sloveniji v letu 2004 je odgovorna razširitev klonskega kompleksa serotipa 14 in 9V, ki je poleg odpornosti proti penicilinu izražal tudi visoko stopnjo odpornosti proti trimetoprimu s sulfametoksazolom in je soroden svetovno razširjenemu klonu Spain<sup>9V</sup>-3.
- Z molekularno tipizacijsko metodo PFGE smo dokazali tudi prisotnost manjšega klonskega kompleksa pnevmokokov serotipa 6B in 6A, ki je soroden mednarodnemu klonu pnevmokokov Poland<sup>6B</sup>-20 in je poleg odpornosti proti penicilinu izražal tudi odpornost proti eritromicinu, tetraciklinu, klindamicinu in trimetoprimu s sulfametoksazolom.
- Molekularna tipizacija invazivnih sevov pnevmokokov in z njo spremeljanje teh in tudi ostalih mednarodno razširjenih odpornih klonov pnevmokokov v Sloveniji je tudi v bodoče nujno potrebna in je velikega javnozdravstvenega pomena, saj le tako lahko sledimo pojavitju pnevmokoknih sevov, odpornih proti različnim antibiotikom, in širjenju mednarodnih odpornih in večkratno odpornih klonov tudi v Sloveniji.

## 6 POVZETEK

Bakterija *Streptococcus pneumoniae*, splošno znana tudi kot pnevmokok, je pomemben povzročitelj invazivnih kot tudi neinvazivnih bakterijskih okužb predvsem pri otrocih in starejših ljudeh. Kljub temu, da je danes na razpolago veliko različnih antibiotikov in cepiv za zdravljenje in preprečevanje pnevmokoknih okužb in bolezni, le te še vedno prispevajo pomemben delež k obolenosti in umrljivosti po vsem svetu, predvsem otrok v državah v razvoju.

Penicilin je od svojega odkritja ostal zdravilo prvega izbora za zdravljenje pnevmokoknih okužb, vendar od 80. let dvajsetega stoletja razširjenost proti penicilinu odpornih in večkratno odpornih pnevmokokov po vsem svetu nenehno narašča. Pojav pnevmokoknih bolezni, ki jih povzročajo proti penicilinu odporni in večkratno odporni sevi pnevmokokov, danes predstavlja velik svetovni javnozdravstveni problem, saj otežuje zdravljenje pnevmokoknih okužb in povečuje tveganje za smrtni izid bolezni.

Najpomembnejši dejavnik tveganja za pojav proti antibiotikom odpornih pnevmokokov je antibiotična izpostavljenost, saj številne raziskave dokazujojo povezano široke uporabe antibiotikov z razvojem bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom hkrati. Za pnevmokokne seve, odporne proti penicilinu, je značilno, da so pogosteje odporni tudi proti drugim antibiotikom.

Povečan pojav odpornosti in večkratne odpornosti pnevmokokov proti antibiotikom je v različnih geografskih območjih sveta domnevno posledica daljše prisotnosti in širjenja manjšega števila uspešnih odpornih klonov pnevmokokov, ki jih lahko identificiramo z uporabo molekularnih tipizacijskih metod. Po pridobitvi genov za odpornost se pnevmokoki namreč primarno širijo klonalno.

V okviru diplomskega dela smo želeli pojasniti pojav velikega porasta proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov v Sloveniji v letu 2004, ko se je njihov delež povzpel iz 17,3 % v letu 2003 na kar 27,5 %. V tem letu je bilo od 171 izoliranih invazivnih sevov kar 47 sevov vmesno odpornih in odpornih proti penicilinu, ki smo jih v okviru diplomskega dela podrobneje preučili.

Predpostavili smo, da je velik porast proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov v letu 2004 posledica razširitve vsaj enega mednarodnega odpornega klena,

zato smo seve analizirali z gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE) skupaj s sedmimi predstavniki mednarodnih odpornih in večkratno odpornih klonov pnevmokokov ter med seboj primerjali njihove restrikcijske vzorce DNA.

Uporabili smo komercialni komplet reagentov »GenePath Group 1« kit z restrikcijskim encimom *Sma*I. Elektroforezo smo izvedli z GenePath elektroforeznim sistemom. Za kontrolo izvajanja postopkov smo uporabili standardni sev bakterije *Staphylococcus aureus* z oznako NCTC 8325. Za slikanje gela smo uporabili digitalni dokumentacijski sistem Gel Doc XR s programom Quantity One Software. Rezultate smo analizirali po merilih, ki jih je objavil Tenover s sodelavci in s programom Fingerprinting II, verzije 3.0. Podobnost sevov smo določili z izračunom koeficiente Dice (optimizacija 1 %, toleranca 1 %).

Med analiziranimi proti penicilinu vmesno odpornimi in odpornimi invazivnimi sevi pnevmokokov je bilo največ sevov serotipa 14, 9V in 6B. Sevi serotipov 14 in 9V so skupaj predstavljeni več kot polovico vseh analiziranih sevov.

Od vseh testiranih proti penicilinu vmesno odpornih in odpornih invazivnih sevov je bilo kar 72 % odpornih tudi proti trimetoprimu s sulfametoksazolom, 28 % proti eritromicinu in 19 % proti tetraciklinu in klindamicinu. Večkratno odpornih je bilo 28 % sevov.

Rezultati molekularne tipizacije z metodo PFGE so pokazali, da je večina sevov serotipov 14 in 9V pripadala istemu klonu ali klonskemu kompleksu kot mednarodno razširjeni odporni klon pnevmokokov Spain<sup>9V</sup>-3. Ugotovili smo tudi, da so štirje sevi serotipa 6B in en sev serotipa 6A pripadali istemu klonskemu kompleksu kot mednarodno razširjeni odporni klon Poland<sup>6B</sup>-20.

Z metodo PFGE smo tako dokazali, da je za pojav porasta proti penicilinu odpornih invazivnih sevov pnevmokokov v Sloveniji v letu 2004 odgovorna razširitev klena ali klonskega kompleksa pnevmokokov serotipa 14 in 9V, sorodnega mednarodnemu odpornemu klonu pnevmokokov Spain<sup>9V</sup>-3.

## 7 VIRI

Appelbaum P.C. 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. Clinical Infectious Diseases, 34: 1613-1620

Aguiar S.I., Serrano I., Pinto F.R., Melo-Cristino J., Ramirez M. 2008. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. BioMed Central Microbiology, 8, 41: 11 str.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/41> (september 2009)

Ambrose K., Stephens D.S. 2004. Macrolide, Quinolone, and other non-β-Lactam antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. V: The pneumococcus. Tuomanen E.I., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 350-366

Barocchi M.A., Ries J., Zogaj X., Hemsley C., Albiger B., Kanth A., Dahlberg S., Fernebro J., Moschioni M., Masignani V., Hultenby K., Taddei A.R., Beiter K., Wartha F., von Euler A., Covacci A., Holden D.W., Normark S., Rappuoli R., Henriques-Normark B. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 8: 2857-2862

Barocchi M.A., Censini S., Rappuoli R. 2007. Vaccines in the era of genomics: The pneumococcal challenge. Vaccine, 25: 2963-2973

Basset A., Trzcinski K., Hermos C., O'Brien K.L., Reid R., Santosh M., McAdam A.J., Lipsitch M., Malley R. 2007. Association of the pneumococcal pilus with certain capsular serotypes but not with increased violence. Journal of Clinical Microbiology, 45, 6: 1684-1689

Bechini A., Boccalini S., Bonanni P. 2009. Immunization with the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine: Impact evaluation, continuing surveillance and future perspectives. Vaccine, 27, 25-26: 3285-3290

Bennett D., Lennon B., Humphreys H., Cafferkey M. 2003. Penicillin susceptibility and epidemiological typing of invasive pneumococcal isolates in the Republic of Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3641-3648

Bergmann C., Chi F., Rachid S., Hakenbeck R. 2004. Mechanisms for penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Penicillin-binding proteins, gene transfer, and cell wall metabolism. V: The pneumococcus. Tuomanen E.I., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 339-349

Bogaert D., de Groot R., Hermans P.W.M. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infectious Diseases*, 4: 144-154

Butler J.C. 2004. Epidemiology of pneumococcal disease. V: The pneumococcus. Tuomanen E.I., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 149-168

Cartwright K. 2002. Pneumococcal disease in western Europe: Burden of disease, antibiotic resistance and management. *European Journal of Pediatrics*, 161: 188-195

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* – United States, 2006-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57: 1353-1355  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5750a2.htm> (september 2009)

Charpentier E., Tuomanen E. 2000. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes and Infection*, 2: 1855-1864

CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: 181 str.

Čižman M. 2005. Cepljenje v letu 2005. *Zdravstveni vestnik*, 74: 281-284

Dagan R., Klugman K.P. 2008. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 8, 12: 785-795

Di Guilmi A.M., Dessen A. 2002. New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. European Molecular Biology Organization Reports, 3, 8: 728-734

EARSS annual report 2004. 2005. Bilthoven, The European Antimicrobial Resistance Surveillance System

[http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%20annual%20report%202004%20webversie\\_tcm61-25345.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%20annual%20report%202004%20webversie_tcm61-25345.pdf) (december 2009): 136 str.

EARSS annual report 2007. 2008. Bilthoven, The European Antimicrobial Resistance Surveillance System

[http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007\\_FINAL\\_tcm61-55933.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf) (december 2009): 156 str.

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2004. 2005. Letno poročilo o gibanju nalezljivih bolezni v Sloveniji. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (14. avg. 2009)

[http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/798-PorocilocCNB\\_2004.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-PorocilocCNB_2004.pdf) (november 2009): 74 str.

NCBI. 2009. Genome project for *Streptococcus pneumoniae*. Rockville Pike, NCBI - National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genomeprj&cmd>ShowDetailView&TermToSearch=12328> (november 2009): 1 str.

Gianfaldoni C., Censini S., Hilleringmann M., Moschioni M., Facciotti C., Pansegrouw W., Masignani V., Covacci A., Rappuoli R., Barocchi M.A., Ruggiero P. 2007. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. Infection and Immunity, 75, 2: 1059-1062

Giele C., Moore H., Bayley K., Harrison C., Murphy D., Rooney K., Keil A.D., Lehmann D. 2007. Has the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine had an impact on invasive pneumococcal disease in Western Australia? Vaccine, 25, 13: 2379-2384

Gray B.M., Musher D.M. 2008. The history of pneumococcal disease. V: Pneumococcal vaccines. Siber G.R., Klugman K.P., Mäkelä P.H. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 3-18

Hammerschmidt S., Paterson G.K., Bergmann S., Mitchell T.J. 2007. Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infections: Adaptive immunity, innate immunity, cell biology, virulence factors. V: Community-acquired pneumonia. Suttorp N., Welte T., Marre R. (eds.). Basel, Birkhäuser: 139-181

Hansman D., Bullen M.M. 1967. A resistant pneumococcus. Lancet, 290, 7509: 264-265

Henrichsen J. 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology, 33, 10: 2759-2762

Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nature Protocols, 2, 3: 677-684

Hicks L.A., Harrison L.H., Flannery B., Hadler J.L., Schaffner W., Craig A.S., Jackson D., Thomas A., Beall B., Lynfield R., Reingold A., Farley M.M., Whitney C.G. 2007. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. Journal of Infectious Diseases, 196: 1346-1354

Hirst R.A., Kadioglu A., O'Callaghan C., Andrew P.W. 2004. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. Clinical & Experimental Immunology, 138: 195-201

Hoskins J., Alborn W.E., Jr., Arnold J., Blaszcak L.C., Burgett S., DeHoff B.S., Estrem S.T., Fritz L., Fu D.J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J.S., Khoja H., Kraft A.R., Lagace R.E., LeBlanc D.J., Lee L.N., Lefkowitz E.J., Lu J., Matsushima P., McAhren S., McHenney M., McLeaster K., Mundy C.W., Nicas T.I., Norris F.H., O'Gara M., Perry R.B., Robertson G.T., Rockey P., Sun P.M., Winkler M.E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C.A., Baltz R.H., Jaskunas S.R., Rosteck P.R., Jr., Skatrud P.L., Glass J.I. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. Journal of Bacteriology, 183, 19: 5709-5717

- Hsieh Y.C., Wang J.T., Lee W.S., Hsueh P.R., Shao P.L., Chang L.Y., Lu C.Y., Lee C.Y., Huang F.Y., Huang L.M. 2006. Serotype competence and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Emerging Infectious Diseases, 12, 11: 1709-1714
- Huo Z., Spencer O., Miles J., Johnson J., Holliman R., Sheldon J., Riches P. 2004. Antibody response to pneumolysin and to pneumococcal capsular polysaccharide in healthy individuals and *Streptococcus pneumoniae* infected patients. Vaccine, 22: 1157-1161
- Ihan A. 2002. Pnevmonok. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 155-158
- Imöhl M., Reinert R.R., van der Linden M. 2009. New penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* and their effects on susceptibility categorisation in Germany (1992-2008). International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 3: 271-273
- Isaacman D.J., McIntosh E.D., Reinert R.R. 2010. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for the future conjugate vaccines. International Journal of Infectious Diseases, 14: e197-e209
- Jacobs M.R. 2004. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and patterns of resistance. American Journal of Medicine, 117, Suppl. 3A: 3S-15S
- Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews Microbiology, 6: 288-301
- Klugman K.P. 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clinical Microbiology Reviews, 3, 2: 171-196
- Knavs N. 2007. Preudarno z antibiotiki. Znanost in tehnologije. Ljubljana, Dnevnik d.d.  
<http://cm.dnevnik.si/novice/znanost/252139> (november 2009): 2 str.

- Lefevre J.C., Faucon G., Sicard A.M., Gasc A.M. 1993. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 31, 10: 2724-2728
- Levine O.S., Farley M., Harrison L.H., Lefkowitz L., McGeer A., Schwartz B. 1999. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. Pediatrics, 103, 3: e28, doi: 10.1542/peds. 103.3.e28: 5 str.
- Lydyard P., Cole M., Holton J., Irving W., Porakishvili N., Venkatesan P., Ward K. 2009. Case studies in infectious disease. New York, Garland Science: 598 str.
- Lynch J.P., Zhanel G.G. 2009. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 30, 2: 189-209
- McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B.G., Tenover F.C., George R., Hakenbeck R., Hryniwicz W., Lefévre J.C., Tomasz A., Klugman K.P. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. Journal of Clinical Microbiology, 39, 7: 2565-2571
- Mitchell T.J. 2004. Pneumolysin and other virulence proteins. V: The pneumococcus. Tuomanen I.E., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 61-74
- Mitchell T.J. 2006. *Streptococcus pneumoniae*: Infection, inflammation and disease. V: Hot topics in infection and immunity in children. Pollard A.J., Finn A. (eds.). New York, Springer: 111-124
- Mizrachi Nebenzahl Y., Porat N., Lifshitz S., Novick S., Levi A., Ling E., Liron O., Mordechai S., Sahu R.K., Dagan R. 2004. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* may be determined independently of capsular polysaccharide. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 233: 147-152

Montagnani F., Zanchi A., Stolzuoli L., Croci L., Cellesi C. 2007. Clindamycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Emerging Infectious Diseases, 13, 5: 801-802

Morona J.K., Morona R., Paton J.C. 2006. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 22: 8505-8510

Mueller-Premru M., Štrumbelj I., Seme K., Ribič H., Tomič V., Kolman J., Franko Kancler T., Zdolšek B., Božanič V., Piltaver-Vajdec I., Paragi M., Dermota U., Fišer J., Sarjanović L., Kavčič M., Harlander T. 2008. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella Catarrhalis* in *Streptococcus pyogenes* – občutljivost izolatov iz dihal in invazivnih izolatov v okviru projekta EARSS za antibiotike leta 2006. V: Novosti v infektologiji. Sodobna raba antibiotikov, ki jih uporabljamo že desetletja. Okužbe s CMV. Infektološki simpozij 2008, Ljubljana, 28.-29. mar. 2008. Beović B., Strle F., Čižman M. (ur.). Ljubljana, Sekcija za kemoterapijo SZD, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center, Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo Medicinske fakultete: 33-42

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002. Streptococcus. V: Medical microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. (eds.). St. Louis, Mosby: 237-257

NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteenth informational supplement. Document M100-S14. Wayne, NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards: 159 str.

O'Brien K.L., Dagan R., Mäkelä P.H. 2008. Nasopharyngeal carriage. V: Pneumococcal vaccines. Siber G.R., Klugman K.P., Mäkelä P.H. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 279-300

Obert C.A., Gao G., Sublett J., Tuomanen E.I., Orihuella C.J. 2007. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae*. Infection, Genetics and Evolution, 7, 6: 708-716

Paragi M., Kolman J., Kraigher A., Čižman M., Gubina M., Ribič H., Novak D., Štorman A., Harlander T., Fišer J., Berce I., Drinovec B., Štrumbelj I., Piltaver I., Košnik I. 2003. Possibility of application of new pneumococcal conjugate vaccines in children in Slovenia. Vaccine, 21: 4708-4714

Paragi M., Čižman M., Kolman J., Mioč V., Kastrin T. 2007. Pneumococcal invasive diseases in Slovenia: Epidemiology, patterns of resistance and prevention. V: 25<sup>th</sup> annual meeting of the European Society for pediatric Infectious Diseases, Porto, May 2-4, 2007. Geneva, Kenes International: 1 str.

Paragi M., Kastrin T., Čižman M., Kolman J., Mioč V., Mueller-Premru M., Ribič H., Novak D., Štorman A., Harlander T., Fišer J., Berce I., Drinovec B., Štrumbelj I., Piltaver I. 2008. Epidemiologija invazivnih pnevmokoknih in meningokoknih okužb v Sloveniji 2004-2007. V: Novosti v infektologiji. Sodobna raba antibiotikov, ki jih uporabljamo že desetletja. Okužbe s CMV. Infektološki simpozij 2008, Ljubljana, 28-29. mar. 2008. Beović B., Strle F., Čižman M. (ur.). Ljubljana, Sekcija za kemoterapijo SZD, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center, Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo Medicinske fakultete: 43-55

Paragi M., Kraigher A. 2009. Laboratorijsko spremljanje IPB v Sloveniji, namen in pomen epidemiološkega spremljanja invazivnih bakterijskih okužb, podatki za obdobje 2004-2008. V: Invazivne pnevmokokne bolezni (IPB). Strokovni simpozij, Ljubljana, 26. mar. 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 12 str.

Park I.H., Pritchard D.G., Cartee R., Branda A., Brandileone M.C.C., Nahm M.H. 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology, 45, 4: 1225-1233

Pfizer. 2009. Pfizer receives European authorization for Prevnar 13\* for the prevention of pneumococcal disease in infants and young children. New York, Pfizer Inc.

<http://www.earthtimes.org/articles/show/pfizer-receives-european-authorization-for,1085838.shtml> (december 2009): 1 str.

Pletz M.W.R., McGee L., Welte T. 2007. Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. V: Community-acquired pneumonia. Suttorp N., Welte T., Marre R. (eds.). Basel, Birkhäuser: 57-72

Reinert R.R. 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clinical Microbiology and Infection, 15, Suppl. 3: 7S-11S

Riedel S., Beekmann S.E., Heilmann K.P., Richter S.S., Garcia-de-Lomas J., Ferech M., Goosens H., Doern G.V. 2007. Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 26: 485-490

Rodriguez A.J., Orihuela C.J. 2008. Aging, inflammation, and pneumococcal disease. V: Sepsis: New strategies for management. Rello J., Restrepo M.I. (eds.). New York, Springer: 53-68

Sadowy E., Izdebski R., Skoczyńska A., Grzesiowski P., Gniadkowski M., Hryniewicz W. 2007. Phenotypic and molecular analysis of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Poland. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 1: 40-47

Sandgren A., Albiger B., Orihuela C.J., Tuomanen E., Normark S., Henriques-Normark B. 2005. Virulence in mice of pneumococcal clonal types with known invasive disease potential in humans. Journal of Infectious Diseases, 192: 791-800

Seme K., 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

- Shaaly A., Gjerde Tellevik M., Langeland N., Høiby E.A., Jureen R. 2005. Comparison of serotyping, pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for typing of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Medical Microbiology, 54: 467-472
- Shinefield H., Black S., Ray P., Fireman B., Schwalbe J., Lewis E. 2002. Efficacy, immunogenicity and safety of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in low birth weight and preterm infants. Pediatric Infectious Disease Journal, 21, 3: 182-186
- Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M.J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clinical Microbiology Reviews, 19, 3: 512-530
- Sjöström K. 2007. Molecular epidemiology of pneumococcal carriage and invasive disease. Thesis for doctoral degree. Stockholm, Karolinska Institutet: 52 str.
- Sjöström K., Blomberg C., Fernebro J., Dagerhamn J., Morfeldt E., Barocchi M.A., Browall S., Moschioni M., Andersson M., Henriques F., Albiger B., Rappuoli R., Normark S., Henriques-Normark B. 2007. Clonal success of pilated penicillin nonsusceptible pneumococci. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 21: 12907-12912
- Stantič Pavlinič M., Pavlinič M. 2008. Pnevkokokne okužbe. ISIS: glasilo zdravniške zbornice Slovenije, 17, 8: 156-157
- Synflorix™. 2009. Synflorix™, GlaxoSmithKline's pneumococcal vaccine, receives European authorisaton. 2009. Brentford, GlaxoSmithKline (31. julij 2009)  
[http://www.gsk.com/media/pressreleases/2009/2009\\_pressrelease\\_10039.htm](http://www.gsk.com/media/pressreleases/2009/2009_pressrelease_10039.htm) (oktober 2009): 1 str.
- Tenover F.C. 2001. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. Clinical Infectious Diseases, 33, Suppl. 3: 108S-115S

Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 9: 2233-2239

Tettelin H., Nelson K.E., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Peterson S., Heidelberg J., DeBoy R.T., Haft D.H., Dodson R.J., Durkin A.S., Gwinn M., Kolonay J.F., Nelson W.C., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Salzberg S.L., Lewis M.R., Radune D., Holtzapfel E., Khouri H., Wolf A.M., Utterback T.R., Hansen C.L., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Angiuoli S., Dickinson T., Hickey E.K., Holt I.E., Loftus B.J., Yang F., Smith H.O., Venter J.C., Dougherty B.A., Morrison D.A., Hollingshead S.K., Fraser C.M. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 293: 498-506

Todar K. 2009. *Streptococcus pneumoniae*: Primary lobar pneumonia. Madison, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology  
<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/S.pneumoniae.html>: 1 str.

Tuomanen E. 2006. *Streptococcus pneumoniae*. V: The prokaryotes. 3<sup>th</sup> ed. A handbook on the biology of bacteria. Vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 149-162

van Belkum A., Struelens M., Visser A., Verbrugh H., Tibayrenc M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 3: 547-560

van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, Suppl. 3: 1S-46S

Vestrheim D.F., Høiby E.A., Aaberge I.S., Caugant D.A. 2008. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 8: 2508-2518

Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer: 1450 str.

Watson D.A., Musher D.M. 1990. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infection and Immunity*, 58, 9: 3135-3138

Weiser J.N. 2000. Phase variation of *Streptococcus pneumoniae*. V: Gram-positive pathogens. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 225-231

Weiser J.N. 2004. Mechanisms of carriage. V: The pneumococcus. Tuomanen I.E., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 169-182

WHO. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Weekly epidemiological record. Geneva, WHO – World Health Organization, 82, 12: 93-104  
<http://www.who.int/entity/wer/2007/wer8212.pdf> (oktober 2009)

Yother J. 2004. Capsules. V: The pneumococcus. Tuomanen I.E., Mitchell T.J., Morrison D.A., Spratt B.G. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 30-48

## ZAHVALA

## PRILOGE

Priloga A: Zbirna preglednica. Prikaz odpornosti proti antibiotikom 47 invazivnih sevov *S. pneumoniae*, izoliranih v Sloveniji v letu 2004.

Oznaka seva	Datum izolacije	Serotip	PEN	CEF (men.)	CEF (nemen.)	CTK (men.)	CTK (nemen.)	ERI	KL	TET	VAN	KLIN	TMP-SMZ
685Po	22. 1. 2004	14	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	R
691Po	28. 1. 2004	14	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
693Po	3. 2. 2004	14	I	I	S	S	S	R	S	R	S	R	S
697Po	6. 2. 2004	14	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
348P	24. 2. 2004	14	R	I	S	I	S	R	S	S	S	S	R
353P	22. 3. 2004	14	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
718Po	15. 4. 2004	14	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
725Po	23. 4. 2004	14	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
729Po	22. 4. 2004	14	R	R	I	R	I	R	S	S	S	S	R
753Po	9. 6. 2004	14	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
360P	5. 8. 2004	14	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R
777Po	6. 10. 2004	14	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
362P	22. 9. 2004	14	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
781Po	12.10. 2004	14	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
367P	26. 10. 2004	14	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
797Po	2. 12.2004	14	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
394P	7. 6. 2004	14	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
779Po	7. 10. 2004	18F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
724Po	21. 4. 2004	19A	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
776Po	4. 10. 2004	19A	R	I	S	I	S	R	S	R	S	R	I
794Po	22. 11. 2004	19A	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
677Po	12. 1. 2004	19F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S – občutljiv, I – vmesno odporen, R – odporen, PEN – penicillin, CEF – cefotaksim, CTK – ceftriakson, ERI – eritromicin, KL – kloramfenikol, TET – tetraciklin, VAN – vankomicin, KLIN – klindamicin, TMP-SMZ – trimetoprim s sulfametoksazolom, men. – meningitični, nemen. – nemeningitični primeri pnevmokoknih bolezni, P – otroci, Po - odrasli

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A: Zbirna preglednica. Prikaz odpornosti proti antibiotikom 47 invazivnih sevov *S. pneumoniae*, izoliranih v Sloveniji v letu 2004.

Oznaka seva	Datum izolacije	Serotip	PEN	CEF (men.)	CEF (nemen.)	CTK (men.)	CTK (nemen.)	ERI	KL	TET	VAN	KLIN	TMP-SMZ
705Po	4. 3. 2004	19F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
712Po	29. 3. 2004	19F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
363P	27. 9. 2004	19F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
730Po	30. 4. 2004	22F	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
778Po	7. 10. 2004	24F	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
345P	8. 1. 2004	6A	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R
700Po	26. 2. 2004	6A	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
680Po	28. 2. 2004	6B	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
684Po	22. 1. 2004	6B	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
351P	16. 3. 2004	6B	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R
358P	8. 6. 2004	6B	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
770Po	10. 9. 2004	6B	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R
364P	6. 10. 2004	6B	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
377P	20. 12. 2004	6B	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I
346P	21. 1. 2004	9V	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
686Po	26. 1. 2004	9V	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
350P	9. 3. 2004	9V	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	R
737Po	26. 2. 2004	9V	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
748Po	28. 5. 2004	9V	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
764Po	12. 7. 2004	9V	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
767Po	2. 8. 2004	9V	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	R
775Po	28. 9. 2004	9V	R	I	S	I	S	R	S	S	S	S	R
783Po	14. 10. 2004	9V	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R
368P	25. 10. 2004	9V	R	R	I	R	I	S	S	S	S	S	I
376P	8. 12. 2004	9V	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R

S – občutljiv, I – vmesno odporen, R – odporen, PEN – penicillin, CEF – cefotaksim, CTK – ceftriakson, ERI – eritromicin, KL – kloramfenikol, TET – tetraciklin, VAN – vankomicin, KLIN – klindamicin, TMP-SMZ – trimetoprim s sulfametoksazolom, men. – meningitični, nemen. – nemeningitični primeri pnevmokoknih bolezni, P – otroci, Po - odrasli