

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ida ISTINIČ

**PLAZMIDNE DETERMINANTE REZISTENCE
PROTI FLUOROKINOLONOM IN
BETALAKTAMSKIM ANTIBIOTIKOM Z
RAZŠIRJENIM SPEKTROM DELOVANJA PRI
IZBRANIH SEVIH BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ida ISTINIČ

**PLAZMIDNE DETERMINANTE REZISTENCE PROTI
FLUOROKINOLONOM IN BETALAKTAMSKIM ANTIBIOTIKOM
Z RAZŠIRJENIM SPEKTRUM DELOVANJA PRI IZBRANIH SEVIH
BAKTERIJE *Escherichia coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PLASMID MEDIATED QUINOLONE AND EXTENDED SPECTRUM
BETA-LACTAM RESISTANCE OF SELECTED *Escherichia coli*
ISOLATES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzenta prof. dr. Miklavža Grabnarja.

Mentorica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzent: prof. dr. Miklavž Grabnar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Miklavž Grabnar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora: 23.12.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ida Istinič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA(KDI)

- ŠD Dn
DK UDK 576.851.49:578.24(043.2)=163.6
KG *Escherichia coli*/ESBL/CTX-M/rezistenca proti kinolonom/*qnr*/aminoglikozid acetiltransferaza/ *aac(6')-Ib-cr*
AV ISTINIČ, Ida
SA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentorica)/GRABNAR, Miklavž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN PLAZMIDNE DETERMINANTE REZISTENCE PROTI FLUOROKINOLONOM IN BETALAKTAMSKIM ANTIBIOTIKOM Z RAZŠIRJENIM SPEKTROM DELOVANJA PRI IZBRANIH SEVIH BAKTERIJE *Escherichia coli*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 102 str., 22 pregl., 7 sl., 3 pril., 112 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pri zbirki 81 izolatov bakterije *E. coli* z ESBL, izoliranih v različnih zdravstvenih ustanovah v Sloveniji v letih 2000-2007, smo z metodo PCR preverili prisotnost skupin β -laktamaz TEM, SHV, OXA, DHA in CTX-M. Pri 74 % izolatov smo našli zapis za več kot eno skupino ESBL. Najpogostejša je bila skupina TEM s 70 %, z 59 % je sledila skupina CTX-M, skupina OXA je bila prisotna pri 41 % in skupina SHV pri 22 % izolatov. Pri CTX-M pozitivnih izolatih smo določili tudi podskupine. Podskupina CTX-M-1 se je pojavila leta 2001, podskupina CTX-M-2 pa leta 2006, delež izolatov z zapisom za β -laktamaze obeh podskupin narašča. S PCR smo preverili prisotnost plazmidno kodiranih zapisov *qnrA*, *qnrS*, *qnrB*, *qepA* in različico gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib-cr*, ki posredujejo nizko stopnjo rezistence proti kinolonom. Gen *aac(6')-Ib-cr* smo odkrili pri 43 % izolatov. Pri enem izolatu (1,2 %) smo odkrili zapis *qnrS*, zapisov *qnrA*, *qnrB* in *qepA* nismo odkrili. S konjugacijo smo prenesli determinante rezistence proti kinolonom v recipientski sev *E. coli* J53 Az^r. Prenos je uspel pri 32 izolatih, pri katerih se je MIC transkonjugante za ciprofloksacin povišala od 1,5-krat do 16-krat. Izolirali in razrezali smo plazmidno DNA iz nekaterih transkonjugant ter določili restrikcijske profile, med katerimi smo opazili podobnost. Da bi izključili klonalno povezanost med izolati, smo uporabili metodo PFGE, izolate uvrstili v filogenetske skupine in preverili prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov. Ugotovili smo, da je kroženje plazmidov med klonalno nepovezanimi sevi vsaj delno krivo za pojav visoko rezistentnih sevov med slovenskimi izolati enterobakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 576.851.49:578.24(043.2)=163.6
CX *Escherichia coli*/ESBL/CTX-M/quinolone resistance/*qnr*/aminoglycoside acetyltransferase/ *aac(6')-Ib-cr*
AU ISTINIČ, Ida
AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/GRABNAR, Miklavž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI PLASMID MEDIATED QUINOLONE AND EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAM RESISTANCE OF SELECTED *Escherichia coli* ISOLATES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 102 p., 22 tab., 7 fig., 3 ann., 112 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Eighty-one ESBL positive *E. coli* isolates that were collected in various medical institutions in Slovenia between the years 2000 and 2007 have been screened by PCR for the presence of β -lactamase groups TEM, SHV, OXA, DHA and CTX-M. Subgroup-specific primers were used to further divide CTX-M group positive isolates. 74 % of all isolates possessed more than one β -lactamase resistance determinat. The most frequent group detected was TEM with 70 %, followed by CTX-M with 59 % , OXA group with 41 % and SHV group with 22 %. Subgroup CTX-M-1 first appeared in 2001 and subgroup CTX-M-2 in 2006. The prevalence of both subgroups is increasing. All isolates were screened for the presence of PMQR. Gene *qnrS* was detected in one isolate (1,2 %), *aac(6')-Ib-cr* was detected in 43 % of isolates, whereas *qnrA*, *qnrB* and *qepA* were not detected. In order to exclude clonal relationship, isolates were placed in one of the *E. coli* phylogenetic groups and/or analysed by PFGE. Selected isolates were screened for the presence of virulence factors. Additionally, quinolone resistance was transferred to the recipient strain *E. coli* J53 Az^r by conjugation. Thirty-two transconjugants with up to 16-fold increase in MIC of ciprofloxacin were recovered. Plasmid DNA from selected transconjugants was isolated and digested with restriction enzyme *Pst*I. Plasmid restriction profile revealed the presence of several different plasmids, most of them having a similar backbone. According to our results the spread of plasmid mediated β -lactam and quinolone resistance in the studied strain collections is the result of horizontal gene transfer of resistance genes rather than of clonal dissemination.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA(KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 Filogenetske skupine	4
2.2 OKUŽBE SEČIL	5
2.3 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL	6
2.4 DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN MEHANIZMI REZISTENCE PROTI NJIM	7
2.4.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin	7
2.4.2 Mehanizmi rezistence proti protimikrobnim učinkovinam	8
2.5 β -LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI	9
2.5.1 Delovanje β -laktamskih antibiotikov	9
2.5.2 Odpornost proti β -laktamskim antibiotikom	10
2.5.3 Evolucija β -laktamaz	10
2.5.4 Klasifikacija β -laktamaz	13
2.6 ESBL IN PROBLEMATIKA SEVOV Z ESBL.....	16
2.6.1 Značilnosti ESBL	16
2.6.2 Skupine ESBL	16
2.6.3 Epidemiologija ESBL.....	20

2.6.4	Zdravljenje infekcij s sevi ESBL.....	21
2.7	KINOLONI.....	22
2.7.1	Delovanje kinolonov	23
2.7.2	Mehanizmi rezistence proti kinolonom	24
2.8	SULFMETOKSAZOL TRIMETOPRIM.....	32
2.8.1	Delovanje sulfmetoksazol-trimetoprima	32
2.8.2	Mehanizmi rezistence proti sulfmetoksazol- trimetoprimu.....	32
2.9	AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTIKI	33
2.10	VIRULENTNI DEJAVNIKI.....	33
2.10.1	Adhezini	34
2.10.2	Toksini in invazini.....	34
2.10.3	Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu	35
3	MATERIAL IN METODE	37
3.1	MATERIAL.....	37
3.1.1	Bakterijski sevi	37
3.1.2	Gojišča.....	37
3.1.3	Kemikalije	38
3.1.4	Encimi.....	40
3.1.5	Pufri in reagenti	41
3.1.6	Oprema	41
3.2	METODE.....	43
3.2.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	43
3.2.2	Agarozna gelska elektroforeza	48
3.2.3	Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin ESBL producirajočih sevov <i>E. coli</i>	49
3.2.4	Restrikcijska analiza PCR pomnožkov	49
3.2.5	Ugotavljanje rezistence proti antibiotikom.....	50
3.2.6	Čiščenje fragmenta dobljenega v reakciji PCR in določitev nukleotidnega zaporedja.....	50

3.2.7	Določanje restrikcijskega profila izbranih ESBL producirajočih sevov <i>E. coli</i>	50
3.2.8	Konjugacija ESBL producirajočih sevov z <i>E. coli</i> J53 Az ^f	51
3.2.9	Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri transkonjugantah.....	52
3.2.10	Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant.....	52
4	REZULTATI.....	54
4.1	ZBIRKA SEVOV ESBL	54
4.2	ANALIZA SEVOV	58
4.2.1	Določanje filogenetskih skupin ESBL producirajočih sevov <i>E. coli</i>	62
4.2.2	Ugotavljanje prisotnosti genov <i>qnr</i> s PCR in sekvenciranje nastalega produkta.....	63
4.2.3	Ugotavljanje prisotnosti alela <i>aac(6')-Ib</i> in <i>aac(6')-Ib-cr</i> , ki kodirata divjo in mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze	64
4.2.4	Ugotavljanje prisotnosti gena <i>qepA</i>	66
4.2.5	Določanje skupin β -laktamaz	66
4.2.6	Ugotavljanje prisotnosti zapisov za nekatere virulentne dejavnike.....	70
4.2.7	Določanje restrikcijskega profila izbranih ESBL producirajočih sevov <i>E. coli</i>	73
4.3	ANALIZA TRANSKONJUGANT	74
4.3.1	Minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri transkonjugantah	74
4.3.2	Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant.....	77
4.3.3	Primerjava plazmidov uropatogenih ESBL izolatov <i>E. coli</i> in <i>Klebsiella</i>	79
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	81
5.1	SKLEPI.....	89
6	POVZETEK.....	91
7	VIRI	92

7.1	CITIRANI VIRI.....	92
7.2	NECITIRANI VIRI	102

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine	4
Preglednica 2: Glavne skupine β -laktamskih antibiotikov in nekateri predstavniki teh skupin	9
Preglednica 3: β -laktamaze pri po Gramu negativnih bakterijah.....	15
Preglednica 4: Generacije kinolonov s primeri in njihova medicinska uporaba.....	23
Preglednica 5: Laboratorijska seva <i>E. coli</i> , ki smo ju uporabili pri delu	37
Preglednica 6: Založne in končne koncentracije protimikrobnih sredstev v gojišču LB...	38
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR.....	43
Preglednica 8: Zbirka sevov ESBL iz Bolnišnice Golnik.....	54
Preglednica 9: Zbirka sevov <i>E. coli</i> , ki izločajo ESBL, zbrane v ZZV Murska Sobota.....	55
Preglednica 10: Zbirka sevov uropatogenih <i>E. coli</i> , ki izločajo ESBL, iz Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana	56
Preglednica 11: Rezultati analize sevov ESBL.....	59
Preglednica 12: Uvrstitev sevov <i>E. coli</i> iz zbirk v filogenetske skupine	62
Preglednica 13: Velikost fragmentov po restrikciji qac1/qac2 PCR pomnožkov z encimoma <i>TaaI</i> in <i>NdeI</i>	64
Preglednica 14: Prisotnost divjega tipa gena za aminoglikozid acetiltransferazo <i>aac(6')-Ib</i> in mutirane različice <i>aac(6')-Ib-cr</i>	66
Preglednica 15: Pari začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje genov, na podlagi katerih uvrščamo encime CTX-M v podskupine.....	67
Preglednica 16: Določanje skupin β -laktamaz.....	69
Preglednica 17: Povprečno število izbranih virulentnih dejavnikov (VD) pri ESBL sevih <i>E. coli</i> iz posameznih filogenetskih skupin	70
Preglednica 18 : Virulentni dejavniki sevov <i>E. coli</i> , ki izločajo ESBL	71
Preglednica 19: Razdelitev sevov glede na restrikcijski profil genomske DNA	73
Preglednica 20: MIC za ciprofloksacin pri transkonjugantah.....	76
Preglednica 21: Razvrstitev plazmidov, izoliranih iz transkonjugant v razrede.....	78

Preglednica 22: Značilnosti donorskih sevov transkonjugant, katerih plazmidi so si sorodni	79
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Lega gena <i>qnrS</i>	28
Slika 2: Primer elektroforeze PCR pomnožkov treh filogenetskih markerjev.....	62
Slika 3: Primer elektroforeze PCR pomnožkov gena <i>qnrS</i>	63
Slika 4: Primer elektroforeze PCR pomnožkov zapisa za β -laktamaze skupine CTX-M-168	
Slika 5: Primera difuzijske metode Etest, s katero smo ugotavljali MIC za ciprofloksacin75	
Slika 6: Restriksijski profil plazmidov 21 transkonjugant po restrikciji s <i>PstI</i>	77
Slika 7: Primerjava restriksijskih profilov plazmidov izoliranih iz <i>E. coli</i> in <i>Klebsiella</i> ..	80

KAZALO PRILOG

Priloga A: Antibiogrami izolatov zbranih v Bolnišnici Golnik

Priloga B: Antibiogrami izolatov zbranih v IVZ Murska Sobota

Priloga C: Antibiogrami izolatov zbranih v IVZ Ljubljana

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ap.....	ampicilin
Az.....	natrijev azid
BHI.....	gojišče "brain hearth infusion"
bp.....	bazni par
Cip.....	ciprofloksacin
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA.....	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
EDTA....	etilendiamintetraocetna kislina
EHEC.....	enterohemoragični sevi <i>Escherichia coli</i>
ESBL.....	beta laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (extended-spectrum β -lactamases)
ExPEC.....	izvenčrevesni patogeni sevi <i>Escherichia coli</i> (extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>)
IRT.....	beta-laktamaze, ki jih inhibitorji ne zavirajo (inhibitor resistant TEM enzymes)
IVZ.....	Inštitut za varovanje zdravja
kb.....	kilobaza
LB.....	gojišče Luria-Bertani
MAC.....	kompleks, ki napade membrano (membrane attack complex)
MIC.....	minimalna inhibitorna koncentracija (minimal inhibitory concentration)
PBP.....	penicilin vezoči proteini (penicillin binding proteins)
PCR.....	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PFGE.....	elektroforeza v pulzirajočem polju (pulse-field gel electrophoresis)
PMQR.....	plazmidno posredovana rezistenca proti kinolonom (plasmid-mediated quinolone resistance)
RNA.....	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
RNAza....	encim, ki cepi molekule RNA
SDS.....	natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulphate)
TBE.....	Tris-boratni elektroforezni pufer
Tc.....	tetraciklin

TE.....Tris-EDTA

Tp.....trimetoprim

UPEC.....uropatogeni sevi *Escherichia coli*

UTI.....okužbe sečil (urinary tract infections)

UV.....ultravijolična (svetloba)

ZZV.. Zavod za zdravstveno varstvo

1 UVOD

Nabor kliničnih protimikrobnih sredstev se je vse od prve uporabe penicilina vseskozi povečeval. Začetku uporabe vsakega novega sredstva pa je kmalu sledil pojav rezistentnih izolatov. V zadnjem času vse pogosteje poročajo o bakterijah proti katerim ni učinkovito nobeno izmed protimikrobnih sredstev. Bakterije so postale rezistentne bodisi zaradi mutacij in/ali horizontalnega prenosa genov, ki kodirajo rezistenco.

V Sloveniji je v zadnjih letih poleg proti meticilinu in vankomicinu odpornih izolatov bakterije *Staphylococcus aureus*, najbolj zaskrbljujoče naraščanje izolatov iz skupine enterobakterij, ki so rezistentne proti betalaktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja in hkrati tudi proti kinolonom.

Sevi, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja, so klinično rezistentni proti penicilinom, monobaktamom in večini cefalosporinov. Zapisi, ki omogočajo rezistenco, so največkrat na konjugativnih plazmidih. Pogosto se pojavljajo skupaj z zapisi, ki posredujejo rezistenco proti aminoglikozidom, trimetoprim-sulfmetoksazolu in še nekaterim protimikrobnim sredstvom. Vse več je izolatov, ki na plazmidih poleg vseh teh rezistenc nosijo še zapise, ki posredujejo nizko stopnjo rezistence proti kinolonom.

Sevi bakterije *Escherichia coli*, ki so hkrati odporni proti celi vrsti antibiotikov, imajo praviloma manj genov z zapisi za virulenčne dejavnike. To pa pomeni, da se lažje ohranijo in krožijo med populacijami bakterij. Ti sevi pogosto prenašajo gene, ki posredujejo odpornost, še zlasti, če so le-ti na mobilnih genetskih elementih.

1.1 NAMEN DELA

Pri delu smo uporabili tri zbirke izolatov bakterije *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Zbirke so identificirali v Inštitutu za varovanje zdravja Ljubljana, Zavodu za zdravstveno varstvo Murska Sobota in v Bolnišnici Golnik.

Pri vseh izolatih smo z verižno reakcijo s polimerazo ugotavljali prisotnost izbranih skupin genov *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} in *bla*_{CTX-M}, ki kodirajo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja in plazmidno kodiranih genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* in *aac(6')-Ib-cr*, ki posredujejo odpornost proti fluorokinolonom. Ugotovili smo kdaj in na katerem koncu Slovenije so se pri izolatih *E. coli* pojavili genski zapisi, ki kodirajo β-laktamaze iz skupine CTX-M in geni *qnr* ter *aac(6')-Ib-cr*, ki kodirajo s plazmidi posredovano odpornost proti kinolonom.

S konjugacijami smo prenesli plazmide iz primarnih izolatov v laboratorijski sev *E. coli* J53 Az^r. Pri transkonjugantah smo povečanje odpornosti proti ciprofloksacinu ugotavljali z Etesti. Nekatere plazmide, s katerimi so se prenesli zapisi za rezistenco proti beta-laktamom z razširjenim spektrom delovanja in fluorokinolonom, smo izolirali in razrezali z restrikcijskim encimom *PstI*. Po elektroforezi smo s pomočjo analize restrikcijskega profila skušali ugotoviti podobnost med plazmidi.

Izolirali in razrezali smo genomsko DNA nekaterih primarnih izolatov ter jo nato ločili z elektroforezo v pulzirajočem električnem polju. Z analizo dobljenih fragmentov smo ugotovljali sorodnost med izolati. Sorodnost smo preverjali tudi z določitvijo filogenetskih skupin in prisotnostjo izbranih virulentnih dejavnikov.

Na osnovi dobljenih podatkov smo sklepali ali je porast odpornih sevov posledica klonalnega širjenja bakterije *E. coli* ali pa je šlo za širjenje enakega ali podobnega plazmida v različnih sevih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterijo *E. coli* uvrščamo med γ -proteobakterije, v red Enterobacteriales, družino Enterobacteriaceae in rod *Escherichia*. Je eden izmed najbolj raziskanih prokariotskih organizmov.

Bakterije iz reda Enterobacteriales so fakultativno anaerobne, po Gramu negativne nesporulirajoče palčke, ki so, kadar so gibljive, peritriho običkane. Imajo preproste prehranjevalne zahteve. Poznanih je mnogo tehnik izolacije in identifikacije enterobakterij. V kliničnih okoljih so najuporabnejši biokemijski testi, ločimo pa jih lahko tudi na podlagi antigenov s serološkimi metodami. Enterobakterije imajo fimbrije, s katerimi se pritrdijo na površino mukoznih membran. Imajo tudi specializirane spolne pile, s pomočjo katerih si izmenjujejo genetski material, ki pogosto vključuje gene za odpornost proti antibiotikom (Tortora in sod., 2001).

Bakterije iz rodu *Escherichia* so univerzalni prebivalci črevesnega trakta ljudi in ostalih toplokrvnih živali, kjer imajo vlogo sinteze vitamina K. Pomembna vloga je tudi preprečevanje naselitve patogenih bakterij v črevesju. Kot fakultativni anaerobi porabljajo kisik in ustvarjajo anoksičnost v debelem črevesju (Madigan in sod., 2003).

Bakterijo *E. coli* je leta 1885 odkril nemški pediater in bakteriolog Theodor Escherlich. Gre za 2 μm dolge paličasto bakterijo s premerom 0,8 μm . Optimalno raste pri temperaturi 37°C (Madigan in sod., 2003). Genetski material *E. coli* je zelo raznolik. Ima krožen kromosom in pogosto tudi plazmide. Kromosom ima pri sevu K12 4,6 milijona baznih parov (Blattner in sod., 1997) in 5,5 milijona baznih parov pri enterohemoragičnem sevu O157:H7 (Hayasi in sod., 2001). Razlike v količini genskega materiala so posledica horizontalnega prenosa genov s plazmidi in drugimi prenosljivimi genetskimi elementi. Vsebnost G:C parov je med 49 in 52 odstotki (Madigan in sod., 2003).

Poznamo približno 200 sevov *E. coli*, ki povzročajo gastrointestinalne motnje. Vsi patogeni sevi *E. coli* imajo specializirane fimbrije, ki jim omogočajo pritrditev na epitel črevesja. Do okužb pride z uživanjem kontaminirane hrane in vode. Glede na produkcijo

toksinov in bolezni, ki jih povzročajo, razvrščamo patogene seve v več kategorij. Enterohemoragične *E. coli* (EHEC) sintetizirajo verotoksin, ki povzroči krvavenje. Po zaužitju vode ali hrane okužene s specifičnim sevom EHEC - *E. coli* O157:H7, pride do rasti in izločanja verotoksina v tankem črevesju. Enterotoksigene *E. coli* sintetizirajo dva temperaturno labilna enterotoksina. Poznamo še enteropatogene *E. coli*, enteroinvazivne *E. coli*, enteroagregativne in difuzno adherentne *E. coli*. Sevi, ki povzročajo bolezni izven prebavnega trakta so t.i. ekstraintestinalni patogeni sevi *E. coli* ali ExPEC. V to skupino uvrščamo tudi seve, ki povzročajo okužbe sečil (UPEC) in seve, ki povzročajo meningitis (Bekal in sod., 2003; Marrs in sod., 2005; Russo in sod., 2001; Madigan in sod., 2003).

2.1.1 Filogenetske skupine

Seve *E. coli* lahko na podlagi prisotnosti določenih genov oziroma fragmentov kromosomske DNK razdelimo v t.i. filogenetske skupine. Te skupine so A, B1, B2 in D. Delitev je narejena na osnovi treh specifičnih odskov DNA, ki so jih našli v DNK knjižnici *E. coli* in jih lahko uporabimo kot filogenetske markerje. To so *chuA*, gen za transport hema v enterohemoragičnem sevu O157:H7 ter gen *yjaA* in fragment TSPE4.C2 z neznano funkcijo (Clermont in sod., 2000; Zhang in sod., 2002). Skupine A, B2 in D lahko še dodatno razdelimo na podskupine A₀, A₁, B2₂, B2₃, D₁, D₂ (Branger in sod., 2005).

Preglednica 1. Razdelitev v filogenetske skupine in podskupine (povzeto po Branger in sod., 2005). Znak + pomeni prisotnost gena, znak – pa odsotnost.

filogenetska skupina	filogenetska podskupina	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	A ₀	-	-	-
	A ₁	-	+	-
B1		-	-	+
B2	B2 ₂	+	+	-
	B2 ₃	+	+	+
D	D ₁	+	-	-
	D ₂	+	-	+

Virulentne ExPEC seve *E. coli* avtorji večinoma uvrščajo v skupini B2 in D, medtem ko so glede na dosedanje raziskave komenzalni sevi najpogosteje iz skupin A in B1 (Zhang in sod., 2002).

Sevi iz skupin B2 in D imajo pogosto zapise za virulentne dejavnike, ki jih sevi iz skupin A in B1 nimajo. Poleg tega pa je bila opažena tudi povezava med virulenco in odpornostjo proti antibiotikom. Sevi iz skupin A in B1 z malo virulentnimi dejavniki pogosteje nosijo zapise za odpornost proti različnim protimikrobnim spojinam (Branger in sod., 2005).

2.2 OKUŽBE SEČIL

Okužbe sečil so najpogostejši vzrok bolnišničnih in izvenbolnišničnih okužb v razvitih državah. Pojavijo se lahko v akutni ali kronični obliki ter so glede na mesto prisotnosti različno nevarne. Zaradi anatomskih razlik med spoloma je bolezen pogostejša pri ženskah. Vsaj 40 odstotkov žensk se vsaj enkrat v življenju sreča z akutno infekcijo sečil. Pri polovici od teh so okužbe ponavljajoče. Prizadete so predvsem spolno aktivne ženske, starejši ljudje in bolniki s katetskimi vstavki. Bolniki s funkcijsko ali anatomsko nepravilnostjo sečil, diabetiki ter nosečnice pa so podvrženi večjemu tveganju za razvoj zapletene oblike okužbe (Stamm in Norrby, 2001; Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

Povzročitelji okužb sečil so različni, odvisno od prizadetega mesta okužbe, spola, starosti in zdravstvenega stanja pacienta. Vzrok za 90-odstotkov akutnih okužb je *E. coli*, ostali povzročitelji pa so *Staphylococcus saprophiticus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ter bakterije iz rodov *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* in *Shigella* (Stamm in Hooton, 1993; Anderson in sod., 2004; Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

Najpogostejša okužba sečil je vnetje mehurja ali cistitis, ki se kaže z značilnimi simptomi, med katerimi sta najbolj opazna pogosto in boleče uriniranje. Diagnozo potrdimo, ko je v primerno odvzetem urinu prisotnih tisoč ali več bakterij na mililiter. Najresnejša okužba sečil je akutno vnetje ledvic ali pielonefritis. Do nje pride, ko bakterije iz mehurja pridejo do ene ali obeh ledvic in se tam naselijo. Bolezen spremljajo znaki kot so bolečine v spodnjem delu trebuha, vročina, slabost in prisotnost bakterij v krvi (Bahrani-Mougeot in sod., 2002). V 95 odstotkih je okužba posledica kolonizacije po ascendentni ali

transuretralni poti, kar pomeni, da se infekcija začne s kolonizacijo sečnice in se nadaljuje navzgor do mehurja, v nekaterih primerih pa še naprej po sečevodih do ledvic. Druga pot okužbe je descendentna ali hematogena, pri kateri bakterije vstopijo v sečila iz krvnega obtoka (Bahrani-Mougeot in sod., 2002; Stamm in Norrby, 2001).

2.3 ZDRAVLJENJE OKUŽB SEČIL

Bakterijske okužbe sečil se najpogosteje zdravi s protimikrobnimi spojinami. To so lahko antibiotiki v ožjem pomenu besede (produkti gliv in bakterij) ali umetni substrati (umetno sintetizirane spojine). Antibiotiki so lahko baktericidni ali bakteriostatični. Prvi povzročijo propad, drugi pa zavrejo razmnoževanje bakterij (Gubina in Ihan, 2002).

Za zdravljenje infekcij sečil se najpogosteje uporablja kombinacija zdravila sulfmetoksazol-trimetoprim, kinoloni ali β -laktami. V Sloveniji se pri zdravljenju okužb v zdravstvenih domovih v 57% predpiše zdravilo sulfmetoksazol-trimetoprim, v 37% fluorokinolone, v ostalih primerih pa β -laktame kot so cefalosporini ali semisintetični penicilini (Car in Marinko, 2003).

Zdravljenje infekcij sečil s protimikrobnimi učinkovinami ni vedno uspešno. Težave se pojavijo predvsem v primeru invazivnih postopkov kot je cistoskopija in vstavljanje katetrov. Pri teh postopkih pogosto pride do okužb z bakterijami iz bolnišničnega okolja. To so največkrat po Gramu negativne enterobakterije, ki so rezistentne proti širokemu spektru protimikrobnih učinkovin. Glavni vzrok za neuspešno zdravljenje je poleg bakterijske rezistence proti protimikrobnim učinkovinam še rast bakterij v biofilmih. Na katetrskih vstavkih se pogosto tvorijo biofilmi patogenih bakterij. V biofilmu so bakterije obdane s polisaharidnim matriksom, ki ščiti bakterije pred protimikrobno učinkovino. Bakterije, ki so najbolj zaščitene, preživijo protimikrobno terapijo ter nato tvorijo nov biofilm (Spoering in Lewis, 2001).

2.4 DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN MEHANIZMI REZISTENCE PROTI NJIM

2.4.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin

Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin so encimi ali metabolni procesi, ki so ključni za normalno delovanje bakterijske celice:

❖ **Sinteza celične stene**

Na sintezo peptidoglikana celične stene vplivajo β -laktamski antibiotiki (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami) in glikopeptidi (vankomicin). Bacitracin pa vpliva na dostavo gradnikov celične stene preko membrane.

❖ **Celična membrana**

Baktericidni celični polipeptidi, kot so polimiksini, razgrajujejo fosfolipidni dvosloj.

❖ **Sinteza proteinov (inhibicija 50S ribosomske podenote)**

Protimikrobne učinkovine, kot sta kloramfenikol in makrolidi, z vezavo na ribosomsko DNA preprečijo tvorbo peptidne vezi.

❖ **Sinteza proteinov (inhibicija 30S ribosomske podenote)**

Tetraciklini preprečijo vezavo aminoacil-tRNA na A mesto na ribosomski podenoti in onemogočijo iniciacijo translacije. Aminoglikozidi (streptomycin, gentamicin, kanamicin) zaradi vezave na 30S ribosomsko podenoto preprečijo pravilno translacijo proteina. Nastali protein se razgradi.

❖ **Sinteza nukleinskih kislin**

Sulfonamidi (sulfmetoksazol) vplivajo na encim dihidropteroat sintetazo, trimetoprim pa na dihidrofolat reduktazo. Oba encima sodelujeta pri sintezi purinov in pirimidinov. Rifampin zavira od DNA odvisno RNA polimerazo. Aktinomicin zavira elongacijo, mupirocin in puromicin vplivata na tRNA.

❖ **Dna giraza**

Kinoloni (nalidiksična kislina, ciprofloksacin, norfloksacin) ovirajo delovanje DNA giraze in preprečijo superzvijanje DNA (Madigan in sod., 2003).

2.4.2 Mehanizmi rezistence proti protimikrobnim učinkovinam

Rezistenca proti protimikrobnim učinkovinam je zmožnost bakterijske rasti kljub prisotnosti teh učinkovin. Nekatere bakterije so proti določenim skupinam učinkovin naravno rezistentne. Rezistenco pa lahko pridobijo tudi z mutacijami ali prenosom genov za rezistenco z drugih bakterij.

Poznamo šest glavnih mehanizmov rezistence:

- ❖ **Odsotnost strukture na katero protimikrobna učinkovina deluje**
Nekatere bakterije, kot na primer mikoplazme, nimajo celične stene in so zato rezistentne proti penicilinom.
- ❖ **Neprepustnost bakterijske membrane za protimikrobno učinkovino**
Večina po Gramu negativnih bakterij je neprepustna za penicilin.
- ❖ **Prisotnost gena, čigar produkt je sposoben kemijske modifikacije ali hidrolize protimikrobne učinkovine**
Prisotnost β -laktamaz, ki hidrolizirajo β -laktamski obroč.
- ❖ **Sprememba tarčnega mesta delovanja protimikrobne učinkovine z mutacijo**
Mutacije v kromosomskih genih za DNA girazo spremenijo vezavno mesto za protimikrobno učinkovino.
- ❖ **Odprtje nove metabolne poti z mutacijo**
Nova metabolna pot je alternativna tisti, ki jo protimikrobna učinkovina onemogoča.
- ❖ **Prisotnost membranskih črpalk, ki izčrpajo protimikrobno učinkovino iz celice**

Kadar je rezistenca posledica mutacij genov na kromosomu se prenaša večinoma le vertikalno (iz generacije v generacijo). V kolikor pa rezistenco omogoča samostojni genski zapis, pa se ta lahko prenaša horizontalno z mobilnimi genetskimi elementi kot so plazmidi, transpozoni, bakteriofagi in integri. Horizontalni prenos običajno poteka med bakterijami v isti združbi. Pri bakterijah se geni lahko prenašajo znotraj vrste, med različnimi vrstami, različnimi rodovi, ali pa celo med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami (Madigan in sod., 2003).

2.5 β -LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI

β -laktamski antibiotiki so največja in najbolj pogosto uporabljena skupina protimikrobnih sredstev. Mednje spadajo penicilini, cefalosporini, cefamicini, karbapenemi in monobaktami. Vsem antibiotikom te skupine je skupen β -laktamski obroč, na katerega se pri penicilinih veže petčlenski, pri cefalosporinih pa šestčlenski obroč. Oba vsebujeta žveplo. Pri karbapenemih je na β -laktamski obroč vezan petčlenski obroč, monobaktami pa so β -laktami brez sekundarnega obroča (Livermore in Williams, 1996).

Preglednica 2: Glavne skupine β -laktamskih antibiotikov in nekateri predstavniki teh skupin (http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam_antibiotic).

skupina β -laktamskih antibiotikov	podskupina	nekateri predstavniki
penicilini		penicilin, oksacilin, meticilin, amoksicilin, ampicilin, piperacilin, kloksacilin
cefalosporini	cefalosporini 1. generacije	cefaleksin, cefalotin, cefazolin, cefaloridin
	cefalosporini 2. generacije	cefaklor, cefuroksim
	cefalosporini 3. generacije	ceftriakson, cefotaksim, cefpodoksim, ceftazidim, cefoperazon, ceftibuten
	cefalosporini 4. generacije	cefepim, cefpirom
karbapenemi		imipenem, faropenem, meropenem
monobaktami		aztreonam

2.5.1 Delovanje β -laktamskih antibiotikov

β -laktamski antibiotiki so inhibitorji sinteze celične stene. Vežejo se na encime transpeptidaze (imenovane tudi penicilin vezoči proteini ali PBP-penicillin binding proteins), ki katalizirajo navzkrižno povezavo stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige. Posledica je, da ne pride do zamreženja celične stene (transpeptidacije) in bakterije postanejo zelo občutljive za lizo. Kompleksi β -laktam-PBP povzročijo tudi sproščanje avtolizinov, ki razgradijo nedokončano celično steno (Madigan in sod. 2003).

2.5.2 Odpornost proti β -laktamskim antibiotikom

Prekomerna uporaba β -laktamskih antibiotikov ima lahko za posledico selekcijo odpornosti, ki lahko nastaja na več načinov. Odpornost proti β -laktamom je lahko posledica:

- ❖ spreminjanja normalnih PBP,
- ❖ tvorbe dodatnih PBP,
- ❖ uporabe alternativnih peptidoglikanskih transpeptidaz,
- ❖ nepropustnost zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah,
- ❖ izločanje β -laktamaz, ki so kromosomsko ali plazmidno kodirane
- ❖ aktivno izčrpavanje iz mesta delovanja (Livermore, 1998; Murray in sod., 1999).

Spreminjanje normalnih PBP in tvorba dodatnih PBP sta najpomembnejša mehanizma odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah, medtem ko imajo pri po Gramu negativnih bakterijah najpomembnejšo vlogo β -laktamaze (Shlaes in Rice, 1999).

β -laktamaze inaktivirajo β -laktamske antibiotike tako, da se najprej reverzibilno in nekovalentno vežejo na ogljikove vezi β -laktamskega obroča. V naslednji stopnji encim s svojo hidroksilno skupino napade β -laktamski obroč in ustvari kovalentno vezan acilni ester. Sledi ločitev aktivnega encima in hidroliziranega ter neaktivnega antibiotika (Livermore, 1995).

2.5.3 Evolucija β -laktamaz

Evolucija β -laktamaz je posledica mnogih mehanizmov:

- ❖ mutacije v enem β -laktamaznem genu (zamenjava nukleotida - posledica je lahko zamenjava aminokislina), ki povzroči drugačno hidrolitično sposobnost encima,
- ❖ dvig učinkovitosti ekspresije β -laktamaz s pomočjo različnih promotorjev ali združitvijo z insercijskimi sekvencami (IS),
- ❖ uporaba kompleksnih regulatornih poti za povečanje koncentracije encima,
- ❖ integracija *bla* genov v mobilne genetske elemente (plazmide, transpozone), kar omogoča horizontalni genski prenos.

Vsi ti mehanizmi so omogočili veliko povečanje deleža bakterij, ki so sposobne hidrolizirati β -laktamske antibiotike, prav tako pa so omogočili natanek širokega spektra raznolikih β -laktamaz (Baquero in sod., 2008).

Evolucijsko ločimo dve skupini β -laktamaz. V prvo skupino sodijo serinske β -laktamaze, za katere je, podobno kot za PBP, značilna aminokislina serin v aktivnem mestu encima. Predvidevajo da so se rezvile iz PBP v zadnjih dveh milijardah let (Madeiros, 1997). Druga skupina β -laktamaz pa so metaloencimi, ki imajo kot kofaktor kovinski ion, večinoma cink (Livermore, 1995).

Iz epidemiološkega stališča je evolucija različnih β -laktamaz potekla sočasno z uvedbo in uporabo β -laktamskih antibiotikov kot terapevtskih sredstev (Baquero in sod., 2008).

Prva β -laktamaza je bila identificirana že 1940 leta pri *E. coli*, vendar pa je ta encim pozornost vzbudil šele 1944 leta, ko so zaradi njega prvič zabeležili neuspeh pri zdravljenju okužbe s *S. aureus*, ki je sintetiziral penicilinaze. Takrat je manj kot 10% izolatov *S. aureus*-a sintetiziralo ta encim, do leta 1950 se je delež zvišal na 80%. Danes znaša že več kot 90%. K tako uspešnemu širjenju je pripomogel prenos plazmidov in selekcija zaradi uporabe antibiotikov. Vendar pa se plazmidi z geni, ki kodirajo β -laktamaze, do takrat še niso razširili na po Gramu negativne bakterije (Baquero in sod., 2008).

Situacija horizontalnega genskega prenosa pa je zato mnogo bolj zaskrbljujoča pri po Gramu negativnih bakterijah. Do 1960 leta so prišli v klinično rabo ampicilin in cefalosporini prve generacije in že 1963 leta so izolirali prvo proti ampicilinu odporno *E. coli*. Odpornost ji je omogočala β -laktamaza, ki so jo kasneje poimenovali TEM-1. Gen *bla*, ki je kodiral ta encim, je bil na transpozicijskem elementu, ki se je vključil v plazmide različnih inkompatibilnostnih skupin. Tako se je odpornost razširila v vse vrste družine Enterobacteriaceae ter v bakterije *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in *Pseudomonas aeruginosa*. Med leti 1970 in 1980 so odkrili TEM-2 β -laktamazo, ki se od TEM-1 razlikuje v le eni aminokislini, prav tako pa so odkrili še več plazmidno kodiranih β -laktamaz (PSE-1, SHV-1, OXA-1) (Baquero in sod., 2008). Poleg encimov TEM-1 so splošno razširjene tudi β -laktamaze poimenovane SHV-1, ki so bile odkrite pri bakterijah

Klebsiella pneumoniae in *E. coli* (Livermore, 1995). Zapis za SHV-1 β -laktamazo je na kromosomu pri večini izolatov *K. pneumoniae* in na plazmidu pri *E. coli* (Chavez in sod., 2001)

Hitro širjenje teh plazmidno kodiranih encimov med patogenimi bakterijami v kliničnih okoljih je v začetku 1980 ustvarilo zaskrbljujočo grožnjo. Vendar pa je težavo začasno rešilo odkritje β -laktamaznih inhibitorjev in njihova uspešna uporaba pri zdravljenju. Bakterijske okužbe so uspešno zdravili s kombinacijo β -laktamskih antibiotikov in inhibitorji β -laktamaz (npr. klavulanska kislina, tazobaktam, sulbaktam). Prav tako pa so takrat v klinično uporabo vpeljali cefalosporine širokega spektra (cefotaksim, ceftriakson in ceftazidim), ki so bili odporni proti hidrolizi z do tedaj znanimi β -laktamazami (Baquero in sod., 2008).

Vendar pa tudi to ni rešilo težav. Kmalu so se pojavili izolati z mutacijami v promotorskih sekvencah ali v genih povezanih z regulacijskimi mehanizmi, ki so hiperproducirali β -laktamaze. Prav tako pa se je pojavila težava, ki je iz evlucijskega stališča izjemno zanimiva. Pojavile so se namreč mutacije v strukturnih genih plazmidno kodiranih β -laktamaz skupine TEM, SHV in OXA, ki so vodile v nastanek mnogo različic s povečanimi afinitetami in povečano hidrolizno aktivnostjo za β -laktamske antibiotike širokega spektra, vključno s cefalosporini 3. in 4. generacije ter monobaktami. Te encime so poimenovali ESBL (β -laktamaze razširjenega spektra, ang. extended spectrum β -lactamase). V to skupino so vključili tudi skupino CTX-M. Plazmidno kodirani geni te skupine so nastali z mobilizacijo kromosomskih genov *bla*_{CTX-M} iz različnih vrst *Kluyvera* (Baquero in sod., 2008).

Pri ESBL encimih so zasledili eksponenten porast izolatov z zapisom zanje. Poleg tega pa so opazili, da je večina ESBL-producirajočih izolatov odpornih proti cefalosporinom razširjenega spektra, aminoglikozidom, fluorokinolonom in/ali sulfonamidom. To dejstvo še poveča pojav disperzije ESBL-producirajočih izolatov kot posledico koseleksijskih procesov. Na srečo pa je večina teh izolatov občutljivih za karbapeneme in njihovo delovanje zavirajo inhibitorji β -laktamaz. Pojavile so se tudi že mutante na katere inhibitorji ne delujejo (IRT- inhibitor resistant TEM enzymes) ter tudi take, ki so odporne

proti cefalosporinom razširjenega spektra (CMT enzymes- complex mutant TEM β -lactamases) (Baquero in sod., 2008).

Med pojavom ESBL in IRT producirajočih izolatov, so se iz kromosomov producentov cefalosporinaz (AmpC) mobilizirali tudi *bla*_{AmpC} geni, ki so se vstavili v transpozicijske elemente znotraj konjugativnih plazmidov (Baquero in sod., 2008).

Karbapeneme so v terapevtske namene začeli uporabljati sredi 80. let prejšnjega stoletja. 1988 pa so prvič zasledili pojav odpornega kliničnega izolata. Šlo je za plazmidno kodirano metalo- β -laktamazo. Raziskave so pokazale, da se razširjenost karbapenemaz povečuje in da bodo v bližnji prihodnosti najverjetneje predstavljali veliko nadlogo (Baquero in sod., 2008).

Opazili pa so tudi naraščajočo stopnjo pojavljanja organizmov z zapisom za več kot eno β -laktamazo, kar še povečuje odpornost teh organizmov in s tem večja njihovo evolutijsko prednost. Vsa ta dejstva opisujejo kompleksnost bodoče epidemiološke evolucije β -laktamaz (Baquero in sod., 2008).

2.5.4 Klasifikacija β -laktamaz

Obstajajo različne klasifikacije β -laktamaz, ki temeljijo na:

- ❖ encimskih lastnosti β -laktamaz (substratni profil) in odgovor na β -laktamske inhibitorje,
- ❖ primarnem zaporedju AK (poznamo razrede A-D),
- ❖ lokacija gena (kromosom ali plazmid), vendar pa ta klasifikacija ni uporabna, saj so lahko *bla* geni mobilizirani in integrirani v transpozone in plazmide (Baquero in sod., 2008).

Klasifikacijo, ki temelji na primarnem zaporedju aminokislin je 1980 leta uvedel Ambler. β -laktamaze razredov A, C in D imajo v aktivnem mestu aminokislino serin, encimi iz B razreda pa potrebujejo Zn^{2+} in jih imenujemo tudi metalo- β -laktamaze. Le te si ne delijo homolognih sekvenc z ostalimi tremi razredi (Baquero in sod., 2008).

1992 leta je Ambler s sod. (1992) klasifikacijo β -laktamaz posodobil. V razred A je uvrstil penicilinaze, cefalosporinaze, in β -laktamaze s širokim spektrom delovanja, ki jih

inhibirajo β -laktamski inhibitorji kot so klavulanska kislina, sulbaktam in tazobaktam. Encimi razreda B razgrajujejo vse β -laktame in niso občutljivi za klavulansko kislino. Večina β -laktamaz razreda A in B je kodiranih na plazmidu. Med β -laktamaze iz razreda C in D pri po Gramu negativnih bakterijah uvrščamo kromosomsko kodirane cefalosporinaze (AmpC) in encime, ki hidrolizirajo oksacilin (OXA) (Bush in sod., 1995). Leta 1995 je bilo v klasifikacijo vključenih 190 β -laktamaz, do leta 2001 pa se je povzpelo na več kot 350 (Greenwood, 2003), danes pa že presega število 700 (Perez in sod., 2007).

ESBL je posebna skupina β -laktamaz, v katero poleg TEM in SHV uvrščamo še številne nove skupine encimov, kot so CTX-M in OXA. Sevi z ESBL v zadnjem času zaradi rezistence proti široki paleti klinično uporabljenih protimikrobnih učinkovin vzbujajo še posebno veliko skrb.

Preglednica 3: β -laktamaze pri po Gramu negativnih bakterijah (prirejeno po Bush in sod., 1995 in Ambler in sod., 1992).

tip β -laktamaz (BL)	primeri	Plazmidno (P) ali kromosomsko (K) kodirana	snovi, na katere encimi delujejo	inhibicija s klavulansko kislino	razred po Amblerju
BL širokega spektra (BSBLs)	TEM-1, TEM-2	P	aminopenicilini, karboksipenicilini, ureidopenicilini, 1GC, 2GC ¹	+++ ²	A
	SHV-1	P ali K		+++	A
	OXA skupina	P		+	D
BL razširjenega spektra (ESBLs)	TEM skupina	P	isto kot BSBLs + 3GC in aztreonam	++++	A
	SHV skupina	P		++++	A
	CTX-M skupina	P	isto kot BSBLs + cefepim	++++	A
	OXA skupina	P		+	D
	ostali	P		isto kot TEM in SHV skupina	++++
<i>ampC</i>	kromosomska <i>ampC</i> pri <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Serratia sp.</i> , ipd.	K	1GC, 2GC, cefamicini, ob odsotnosti represorja pa še 3GC in aztreonam	ne	C
plazmidna <i>ampC</i>	ACC-1, ACT-1, CFE-1, MIR-1, DHA1-2, skupine: CMY, LAT, FOX, MOX	P	isto kot ESBLs + cefamicin	ne	C
karbapenemaze	skupine: IMP, VIM, GIM, KPC, OXA	P ali K	isto kot ESBLs + cefamicin in karbapenem	ne	B
	OXA skupina			+++	A
BL rezistentne proti zaviralcem	različice TEM in SHV		isti substrati kot za BSBL	+	D
				ne	A

¹1, 2, 3, 4 GC- cefalosporini prve, druge, tretje in četrte generacije; ²-znak + pomeni inhibicijo, več kot je znakov, močnejša je inhibicija s klavulansko kislino

2.6 ESBL IN PROBLEMATIKA SEVOV Z ESBL

2.6.1 Značilnosti ESBL

ESBL so encimi, ki cepijo amidno vez v β -laktamskem obroču pri penicilinih, monobaktamih, cefalosporinih prve, druge, tretje in nekaterih cefalosporinih četrte generacije (cefepim, cefpirom). ESBL encimi pa ne cepijo karbapenemov in cefamicinov. Za ESBL je značilno, da njihovo delovanje zavirajo β -laktamazni inhibitorji (klavulanska kislina, tazobaktam, sulbaktam). To fenotipsko lastnost se uporablja za detekcijo sevov, ki izločajo ESBL (Bush in sod., 1995; Paterson in Bonomo, 2005).

Po Amblerju sodijo sevi, ki izločajo ESBL v molekulska razreda A in D (Bush in sod., 1995). ESBL nastajajo iz primarnih β -laktamaz z mutacijami na točno določenih mestih. Mutacije povzročijo vgradnjo druge aminokislina, spremenijo aktivno mesto v encimu in omogočijo hidrolizo β -laktamskih antibiotikov z razširjenim spektrom delovanja. ESBL skupin TEM in SHV ohranjajo sposobnost hidrolize penicilina, vendar katalitično niso tako učinkovite kot encimi iz katerih so se razvile (Bush in Singer, 1989). Povečanje aktivnega mesta v encimu, ki omogoči povišano aktivnost proti cefalosporinom razširjenega spektra, poveča tudi občutljivost ESBL za zaviralce β -laktamaz (Jacoby in Madeiros, 1991).

2.6.2 Skupine ESBL

Večina ESBL leta 1995 so bile različice TEM-1 in SHV-1 β -laktamaz (Bush in sod., 1995), danes pa so najbolj razširjene β -laktamaze, ki spadajo v skupino CTX-M (Bonnet, 2004). Danes je znanih preko 160 različnih TEM ESBL in preko 110 različnih SHV ESBL (<http://www.lahey.org/Studies/>), pojavlja pa se vedno večje število encimov skupin CTX-M in OXA ter ESBL, ki ne spadajo v nobeno od omenjenih skupin oziroma si z encimi TEM, SHV, OXA in CTX-M niso sorodni (Stürenburg in Mack., 2003).

V naslednjih poglavjih so opisane značilnosti do sedaj poznanih β -laktamaz:

- ❖ skupine TEM,
- ❖ skupine SHV,
- ❖ skupine CTX-M,
- ❖ skupine OXA,
- ❖ ostalih β -laktamaz.

2.6.2.1 ESBL skupine TEM

TEM-1 je bila leta 1995 najbolj razširjena β -laktamaza pri po Gramu negativnih bakterijah. Ima sposobnost hidrolize penicilina in prvih cefalosporinov, kot sta cefalotin in cefaloridin. Pri bakterijah vrste *E. coli* je kar 90% odpornosti proti ampicilinu posledica izločanja TEM-1 (Livermore, 1995).

Prvi od encimov, ki se je razvil iz TEM-1 je TEM-2. Odkrili so ga leta 1985 in se od TEM-1 razlikuje v enem samem nukleotidu, posledica je zamenjava aminokislina. Zamenjava povzroči spremembo izoelektrične točke, vendar pa se substratni profil ne spremeni (Barthelemy in sod., 1985). Leta 1988 je Sougakoff prvi poročal o encimu skupine TEM z ESBL fenotipom, ko je odkril TEM-3 (Sougakoff in sod., 1988). Danes je poznanih že 164 TEM β -laktamaz (<http://www.lahey.org/Studies/>). Nekaj od njih je odpornih proti zaviralcem β -laktamaz, večina novih TEM različic pa so ESBL (Bradford, 2001).

2.6.2.2 ESBL skupine SHV

Encim SHV-2 je prva odkrita ESBL. Odkrili so jo Knothe in sodelavci leta 1983. Od encima SHV-1 se razlikuje v le eni aminokislini in sicer je v aktivnem mestu encima na mestu 238 serin zamenjan z glicinom. Ta razlika je omogočila aktivnost proti cefalosporinom tretje generacije (Amabile-Cuevas, 2007). Danes je poznanih že 115 encimov iz te skupine (<http://www.lahey.org/Studies/>).

2.6.2.3 ESBL skupine CTX-M

1990 leta so pri *E. coli* odkrili encim, ki je razgrajeval cefotaksim, ne pa ceftazidima. Poimenovali so ga CTX-M-1 (Bauernfeind in sod., 1992). To je bil prvi encim v družini cefotaksimaz, ki danes obsega že 86 različic (<http://www.lahey.org/Studies/>). Encimi iz te skupine so manj sorodni β -laktamazam iz skupin TEM in SHV kot ostale β -laktamaze, saj se z njimi ujemajo v le okoli 40% aminokislinah (Tzouveleki in sod., 2000). Sevi s CTX-M so bolj občutljivi na tazobaktam kot na sulbaktam ali klavulansko kislino (Paterson in sod., 2003). Danes so encimi, ki spadajo v skupino CTX-M najbolj razširjene β -laktamaze (Bonnet, 2004).

Odkrili so, da so encimi CTX-M sorodni s kromosomsko kodiranimi encimi AmpC bakterije *Kluyvera ascorbata*, saj kažejo več kot 95% podobnost. Zaradi tako visoke sorodnosti predvidevajo, da so se encimi CTX-M razvili iz β -laktamaz *Kluyvera ascorbata* (Humeniuk in sod., 2002). Aleli, ki kodirajo encime iz skupine CTX-M, so bili mobilizirani iz kromosomov *Kluyvera* spp. vsaj osemkrat. Zaradi popolne podobnosti med nekaterimi kromosomsko kodiranimi geni *Kluyvera* spp. in plazmidno kodiranimi geni *bla_{CTX-M}* predvidevajo, da se je mnogo mobilizacij zgodilo nedolgo nazaj. Geni za encime iz skupine CTX-M so bili mobilizirani iz *K. ascorbata* in *K. georgiana*, za nekatere skupine pa še niso odkrili donorskega organizma (Barlow in sod., 2008; Baquero in sod., 2008).

Filogenetske raziskave so pokazale, da lahko encime skupine CTX-M razdelimo v 5 podskupin. Prva je **CTX-M-1**, v katero spadajo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 in FEC-1; druga podskupina je **CTX-M-2**, kamor prištevamo CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-3L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 in Toho-1; tretja je **CTX-M-9**, kamor prištevamo CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17 CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 in Toho-2; v četrto skupino **CTX-M-25** spadata CTX-M-25 in CTX-M-29; zadnja podskupina pa je **CTX-M-8** (Bonnet, 2004).

Geni za encime iz skupine CTX-M so najpogosteje na konjugativnih plazmidih, ki so veliki od 7 do 160 kilobaznih parov. Ti plazmidi imajo pogosto tudi gene za rezistenco proti številnim drugim protimikrobnim učinkovinam, kot so aminoglikozidi, kloramfenikol, trimetoprim, sulfonamidi in tetraciklini, v zadnjem času pa tudi gene, ki omogočajo rezistenco proti kinolonom (PMQR- ang. plasmid-mediated quinolone resistance). Uporaba vseh naštetih protimikrobnih učinkovin pospešuje razširjanje enterobakterijskih sevov s CTX-M (Paterson in Bonomo, 2005). Vendar pa le koseleksijski pritisk ne more razložiti tako hitrega naraščanja deleža CTX-M skupine med ESBL. Ostali faktorji, ki najverjetneje omogočajo porast te skupine, so različni rekombinacijski mehanizmi, ki omogočijo vključitev *bla_{CTX-M}* genov v različne genetske strukture, ki se ohranjajo v različnih okoljih (Canton in Coque, 2006).

Po odkritju plazmidne CTX-M ESBL v Argentini in vzhodni Evropi se je po navodilih mednarodnega inštituta za klinične standarde (CLSI) pri fenotipskih testih za odkrivanje

ESBL poleg ceftazidima začelo uporabljati še cefotaksim. Prisotnost CTX-M je bilo tako lažje zaznati, čemur so sledila številna poročila o njegovi pojavnosti, širom po svetu (Paterson in Bonomo 2005).

Iz Združenih držav Amerike poročajo, da med ESBL sevi že od leta 2003 prevladuje skupina CTX-M (Lewis in sod., 2007). Iz Kanade, Velike Britanije, Italije, Grčije in Španije so poročali, da CTX-M skupina prevladuje tudi v izvenbolnišničnih okužbah z ESBL sevi. To je še posebej zaskrbljujoče, saj je tako ogroženo zdravje vseh ljudi in ne le imunsko oslabljenih hospitaliziranih pacientov. V izvenbolnišničnih okoljih so poleg človeka rezervoar bakterij z zapisom za β -laktamaze skupine CTX-M tudi udomačene živali, kar še olajša širjenje teh genov (preko stika z domačimi živalmi ali preko okužene hrane). Poleg tega so sevi ESBL skupine CTX-M pogosteje multirezistentni, kot sevi iz skupin TEM in SHV (Pitout in sod., 2005). Seveda pa rezervoar teh genov še vedno predstavljajo tudi okoljski mikroorganizmi (npr. *Kluyvera* spp.) (Perez in sod., 2007).

V Evropi med CTX-M pozitivnimi izolati prevladujeta podskupini CTX-M-1 (CTX-M-15) in CTX-M-9 (CTX-M-9 in CTX-M-14) (Perez in sod., 2007).

V Sloveniji so o prisotnosti skupine encimov CTX-M poročali le enkrat. V raziskavi 177 ESBL izolatov *K. pneumoniae*, zbranih v letih 2005 in 2006, so zapis za CTX-M odkrili pri 34% sevov. Pri vseh je šlo za CTX-M prve podskupine, natančneje za encim CTX-M-15. Izolati s CTX-M encimi so bili zbrani v bolnišnicah po vsej Sloveniji (Meško Meglič in sod., 2008).

2.6.2.4 ESBL skupine OXA

Encimi iz skupine OXA spadajo po Amblerju v molekularni razred D. Zanje je značilno, da jih klavulanska kislina le šibko zavira, imajo pa visoko hidrolitično aktivnost proti oksacilinu in kloksacilinu (Bush in sod., 1995). Encimi te skupine so bili v začetku postavljeni v isto skupino zaradi fenotipskih in ne genotipskih lastnosti, saj so raziskovalci opazovali le njihov hidrolitični profil. Zato je homologija med posameznimi encimi skupine OXA samo okoli 20% (Bradford, 2001). Danes je poznanih že 142 encimov iz družine OXA (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Medtem ko so druge skupine ESBL najpogosteje prisotne pri *K. pneumoniae* in *E. coli*, je bila skupina OXA do sedaj najpogosteje opisana pri sevih vrste *P. aeruginosa*, izoliranih v Turčiji in Franciji (Jacoby in Muñoz-Price, 2005). Pri ESBL bakterijah iz rodu *Klebsiella* izoliranih v Sloveniji se *bla*_{OXA-1} skoraj vedno pojavlja na plazmidu, ki vsebuje zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze (Ambrožič Avguštin, neobjavljeno).

2.6.2.5 ESBL ostalih skupin

Poleg najpogostejših 4 skupin ESBL (TEM, SHV, OXA in CTX-M) so odkrili tudi nekatere, ki ne spadajo vanje. Predvsem iz Azije se pojavljajo poročila o vedno novih encimih ESBL, ki pa zaenkrat še niso pogosti. Spadajo v skupine VEB, GES, BES, TLA, SFO, IBC, SME, KPC, VIM, IMP, FEC, CME, PER in CMY (Bradford, 2001; Paterson in Bonomo, 2005; <http://www.lahey.org/Studies/>).

2.6.3 Epidemiologija ESBL

ESBL pozitivni izolati predstavljajo danes po vsem svetu velik problem pri hospitaliziranih bolnikih, v zadnjem času pa se vse več primerov pojavlja pri oskrbovancih domov za ostarele in nehospitaliziranih bolnikih (Wiener in sod., 1999; Baño in sod., 2004). Pojavljanje ESBL se je začelo v zahodni Evropi, verjetno zato, ker se je na tem področju začela tudi klinična uporaba β -laktamskih antibiotikov razširjenega spektra (Bradford, 2001). Kmalu po odkritju ESBL pozitivnih izolatov v Evropi so odkrili prve primere še v Ameriki in Aziji. Delež ESBL pozitivnih izolatov se razlikuje od države do države, med posameznimi ustanovami na istem področju in celo med oddelki znotraj neke bolnišnice (Stürenburg in Mack, 2003).

Geni za ESBL so ponavadi kodirani na plazmidih. Ker so plazmidi konjugativni elementi, se lahko prenašajo med bakterijami iste vrste ali celo med različnimi bakterijskimi vrstami. V izbruhu ESBL pozitivnih *K. pneumoniae* in *E. coli* v ZDA so ugotovili, da so izolati obeh vrst izločali encim TEM-10, ki je bil kodiran na plazmidu. Z elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE) so dokazali, da je bil plazmid izoliran pri različnih sevih, zato so predvidevali, da se je plazmid iz ESBL pozitivnih sevov preselil v bakterije normalne flore (Bradford in sod., 2004). Do enakih zaključkov so prišli tudi v Franciji v raziskavi ESBL pozitivnih bakterij, kjer so pri štirih bakterijskih vrstah (*K. pneumoniae*, *E. coli*,

Enterobacter aerogenes in *Proteus rettgeri*) odkrili enak plazmid, na katerem je bil zapis za encim TEM-24 (Marchandin in sod., 1999).

V svetu je delež ESBL pozitivnih izolatov bakterije *E. coli* med 3,3 in 4,7 %, *K. pneumoniae* med 4,2 in 44 %, *Proteus mirabilis* pa med 9,5 in 35,5 % (Winokur in sod., 2001). Nedvomno je, da je delež sevov z ESBL mnogo višji v deželah z nižjim ekonomskim standardom. Tako je delež sevov z ESBL na Švedskem le 3 %, v Avstraliji 5 %, v Grčiji, Turčiji in na Portugalskem preko 25 % v južni Ameriki pa celo več kot 30 %. Najbolj zaskrbljujoča je situacija v južni Ameriki in Aziji, kjer pogosto pojavljanja ESBL ne spremljajo. V teh deželah so higienske razmere v bolnišnicah neustrezne, uporaba antibiotikov nepremišljena, poleg tega so antibiotiki pogosto na voljo v prosti prodaji. Vsi ti dejavniki skupaj omogočijo nastanek in širjenje rezistenc (Amabile-Cuevas, 2007).

V Sloveniji še ni bilo objavljene obširnejše raziskave o pogostosti ESBL med izolati *E. coli*. Seme in sodelavci (2001) so med 172 ESBL izolati, zbranimi v Kliničnem centru v letu 2000 ugotovili, da je največji delež *K. pneumoniae* (84,3%), sledila je *E. coli* (13,4%) in *Proteus mirabilis* (1,1%). V prvi obsežni raziskavi v Sloveniji je bil med *K. pneumoniae* delež izolatov z ESBL v letu 2005 13,6%, v letu 2006 pa 18,1% (Meško Meglič in sod., 2008).

2.6.4 Zdravljenje infekcij s sevi ESBL

Sevi z ESBL predstavljajo resen problem pri zdravljenju, saj izmed β -laktamskih antibiotikov ostajajo učinkoviti le še karbapenemi. Za zdravljenje infekcij z ESBL se tako najpogosteje uporabljajo kinoloni, vendar se njihova učinkovitost manjša zaradi vse večjega števila izolatov s kromosomsko in plazmidno kodiranimi rezistencami proti kinolonom. Dodaten problem predstavlja še korezistenca proti aminoglikozidom in trimetoprim-sulfmetoksazolu, kar še zmanjšuje možnost terapije s protimikrobnimi sredstvi. Geni za rezistence so pogosto zbrani na velikih konjugativnih plazmidih, kar omogoča horizontalen prenos med bakterijami iste vrste ali celo znotraj vseh enterobakterij. Okužbe z ESBL sevi spremlja visoka smrtnost, še posebej med imunsko oslabljenimi pacienti (Sherley in sod., 2003).

Spremljanje prisotnosti ESBL je torej nujno za izbiro ustrezne terapije in kontrolo izbruhov infekcij. Pregledovanje kliničnih izolatov sevov *Klebsiella sp.*, *E. coli* in še nekaterih enterobakterij na prisotnost ESBL se rutinsko ne izvaja v mnogih državah po svetu. Celo v Evropi in ZDA se izvaja le v polovici kliničnih laboratorijev. Prisotnost ESBL se preverja po principu Jarlierjevega testa, kjer se opazuje rast bakterij na gojišču ob prisotnosti diska z ustreznim β -laktamom (cefotaximom, ceftriaksonom, ceftazidimom, cefepimom in aztreonamom) ob prisotnosti klavulanske kisline. Klavulanska kislina zavira delovanje ESBL, zato se ob stiku diskov pojavi cona zaviranja rasti bakterij. Najbolj enostaven in učinkovit način za detekcijo ESBL je komercialni Etest, ki pa si ga večina laboratorijev, še posebej v revnih državah, ne more privoščiti (Jarlier s sod., 1998 in Helfand in Bonomo 2006).

Najbolj učinkovito zdravilo proti večini infekcij s sevi z ESBL tako ostajajo karbapenemi. Nekateri sevi so občutljivi tudi na delovanje cefamicinov, vendar se teh za zdravljenje ne uporablja. Razlog je hiter pojav rezistence proti njim z mutacijami ali horizontalnim prenosom plazmida z zapisom za AmpC (Casellas s sod., 2003). Za zdravljenje nekaterih infekcij s sevi z ESBL pa je učinkovita kombinacija β -laktamskega antibiotika in klavulanske kisline, ki zavira delovanje nekaterih β -laktamaz (Bret in sod., 1996). V najhujših primerih multirezistentnih po Gramu negativnih bakterijah za zdravljenje uporabljajo kolistin, to je protimikrobno sredstvo iz družine polimiksinov, ki je nekdanj veljal za toksičnega (Li, 2006).

2.7 KINOLONI

Kinoloni so skupina sintetičnih protimikrobnih sredstev, ki zavirajo delovanje bakterijskih topoizomeraz. To so encimi, ki uravnavajo zvijanje verig DNA. Topoizomeraze so prisotne pri vseh bakterijah zato so kinoloni protimikrobne spojine s širokim spektrom delovanja. V humani medicini se rutinsko uporabljajo za zdravljenje okužb sečil ter za zdravljenje okužb z bakterijami rezistentnimi proti β -laktamskim antibiotikom. Uporabljajo se tudi v veterini, pogosto kot preventiva pred respiratornimi infekcijami goveda in perutnine (Madigan in sod., 2003)

Kinolone delimo glede na njihov antibakterijski spekter v štiri generacije. V splošnem imajo predstavniki zgodnejših generacij ožji spekter delovanja. Večina kinolonov uporabljenih v klinične namene, spada v podskupino fluorokinolonov, za katere je značilna fluoro skupina pritrjena na centralni obroč (<http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones>). Nekateri predstavniki kinolonov in njihova uporaba so predstavljeni v preglednici 4.

Preglednica 4: Generacije kinolonov s primeri in njihova medicinska uporaba (prirejeno po Owens in Ambrose, 2000; <http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones>).

generacija kinolonov	primeri	uporaba
1. generacija	cinoksacin, nalidiksična kislina, rosoksacin, oksolinična kislina	zdravljenje preprostih okužb sečil
2. generacija: razred I	norfloksacin, enoksacin, lomefloksacin	zdravljenje preprostih okužb sečil
2. generacija: razred II	ciprofloksacin, ofloksacin	zdravljenje zapletenih okužb sečil, okužb zaradi katetrskih vstavkov, gastroenteritisa, bolnišničnih infekcij, nekaterih spolno prenosljivih bolezni
3. generacija	levofloksacin, grepafloksacin, moksifloksacin, sparfloksacin, gatifloksacin, ceftiofur	zdravljenje vseh zgoraj naštetih okužb in pljučnice
4. generacija	clinafloksacin, trovafloksacin, prulifloksacin	zdravljenje intraabdominalnih okužb

2.7.1 Delovanje kinolonov

Tarča kinolonov so bakterijske topoizomeraze. To so encimi, ki uravnavajo zvijanje kovalentno zaprte verige DNA. Glede na način delovanja ločimo dve skupini topoizomeraz. Topoizomeraze I cepijo le eno verigo DNA in omogočijo prehod druge verige skozi nastalo vrzel. Dodajo ali odvzamejo le en navoj. Topoizomeraze II pa cepijo obe verigi in tako omogočijo prehod drugega dela vijačnice skozi nastalo vrzel, ki jo nato zaprejo. Slednje naenkrat dodajo ali odvzamejo dva navoja. Najbolj raziskana topoizomeraza je DNA-giraza pri *E. coli*, ki spada v skupino topoizomeraz II. Je tetramer iz dveh podenot A in dveh podenot B, ki jih kodirata kromosomska gena *gyrA* in *gyrB*. Podenota A je katalitična podenota, ki cepi in zlepi verigi DNA. DNA-giraza omogoči negativno zvijanje DNA, ki je nujno za nastanek in delovanje replikacijskih vilic in začetek podvajanja verige DNA ob celični delitvi. Poleg tega lahko odstrani pozitivne in negativne supernavoje iz molekule DNA (Murray in sod., 1999).

Kinoloni se vežejo na podenoto A DNA-giraze takrat, ko je ta povezana z DNA in je veriga že prekinjena. Vezava kinolona onemogoči zlepljanje prekinjene verige DNA in tvorbo negativnih navojev. Če je na verigi DNA prisoten kompleks kinolon-DNA-giraza, ta ne more potovati skozi replikacijske vilice. Nadaljna replikacije je tako onemogočena, kompleks se sprost, ostane pa prekinjena veriga DNA. Podvojitvev DNA preprečijo tudi kompleksi, ki so prosto razpršeni po kromosomu in niso povezani z replikacijskimi vilicami (Drlica, 1999).

Pri *E. coli* je dobro raziskana tudi topoizomeraza IV, ki sodi v skupino topoizomeraz II. Je tetramerna molekula iz dveh različnih podenot, kodiranih na genih *parC* in *parE*, ki so homologne podenotam A in B topoizomeraze I. Topoizomeraza IV ločuje podvojene in prepletene kromosome pred celično delitvijo in vpliva na dodatno zvijanje molekul verige DNA. Poznanih je le nekaj bakterij, ki uporabljajo izključno DNA-girazo. Pri večini bakterij sta prisotni tako DNA-giraza kot topoizomeraza IV, ki sodelujeta pri replikaciji, transkripciji, rekombinaciji in popravljanju DNA (Drlica, 1999; Snyder in Champness, 2003).

Mnogi starejši kinolonski antibiotiki (ciprofloksacin, ofloksacin), katere še vedno najpogosteje uporabljamo za zdravljenje, se razlikujejo v delovanju proti DNA girazi in topoizomerazi IV. Pri po Gramu negativnih bakterijah so bolj učinkoviti proti DNA girazi, pri po Gramu pozitivnih pa proti topoizomerazi IV. Kinoloni novejših generacij (clinafloksacin, gatifloksacin, moksifloksacin) pa so zasnovani tako, da delujejo podobno proti obema encimoma (Hooper, 2000).

2.7.2 Mehanizmi rezistence proti kinolonom

Tudi pri fluorokinolonih je široka uporaba povzročila nastanek rezistenc. Poznamo dva tipa rezistenc, ki sta posledica mutacij kromosomskih genov. Prvi tip rezistence je sprememba tarčnih encimov zaradi mutacij. Drugi tip pa je zmanjšana koncentracija kinolona v bakterijski celici zaradi povečanega izražanja membranskih črpalk, ki črpajo kinolone iz celice ali zaradi nepropustnosti membrane. Do pred nedavnim je veljalo, da so mutacije v kromosomskih genih edini mehanizem rezistence proti kinolonom. Vendar pa so raziskovalci odkrili, da lahko tudi plazmidi kodirajo rezistenco proti kinolonom. Zaenkrat je stopnja rezistence, ki jo omogočajo zapisi na plazmidih sicer nizka, vendar pa lahko

skupaj z mutacijami v kromosomskih genih omogoča selekcijo visoko rezistentnih sevov (Jacoby, 2005).

2.7.2.1 Tipi rezistenc proti kinolonom, ki so posledica kromosomskih mutacij

2.7.2.1.1 Rezistenca zaradi spremembe tarčnega mesta

Glavna tarča kinolonov sta encimska kompleksa giraza in topoizomeraza IV. Če pride do mutacije v zapisih za te encime in posledično do zamenjave aminokislin na mestih za vezavo kinolona, je zaradi spremembe afinitete vezava zmanjšana ali onemogočena. Ta mesta so na površini katalitičnih podenot GyrA ali ParC in se imenujejo QRDR (ang. quinolone resistance determining region). Ena ali več zamenjav nukleotidov v regiji QRDR tarčnega encima različno zmanjšajo afiniteto vezave kinolona na kompleks encim-DNA (Willmot in Maxwell, 1993).

Glavna tarča kinolonov pri po Gramu negativnih bakterijah je DNA-giraza, zato se pri njih mutacije najprej pojavijo v katalitični podenoti GyrA. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa je glavna tarča kinolonov topoizomeraza IV, zato se mutacije pojavijo prednostno v podenoti ParC. Rezistenca proti novejšim kinolonom, ki na oba encima vplivajo enako, pa se razvije težje, saj je ob pojavu ugodne mutacije v enem encimu drugi encim proti kinolonom še vedno občutljiv (Deguchi in sod., 1997 in Yague in sod., 2002).

Ko začetna mutacija v regiji QRDR pri po Gramu negativnih bakterijah povzroči rezistenco proti kinolonom, se lahko pojavijo dodatne mutacije v ostalih regijah podenote GyrA ali pa v podenotah GyrB in ParC. Te mutacije rezistenco proti kinolonom še povišajo, vendar pa same po sebi, ob prisotnosti GyrA divjega tipa, ne posredujejo nobene rezistence (Barnard in Maxwell, 2001).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za kinolone je pri različnih sevih odvisna od mesta, vrste in števila zamenjav nukleotidov v genih za topoizomeraze. Bolj je aminokislinsko mesto pomembno za interakcijo s kinolonom, večja je sprememba MIC ob zamenjavi (Vila in sod., 1999).

2.7.2.1.2 Rezistenca z zmanjšanim vnosom ali izčrpavanjem kinolonov

Kinoloni, kateri so hidrofobne narave, lahko vstopijo v celico z difuzijo skozi membrano, sicer pa vstopajo skozi porine. Kromosomske mutacije, ki spremenijo sestavo membran ali zmanjšajo število membranskih porinov, zagotovijo manjšo občutljivost bakterij za kinolone. Tako pri po Gramu negativnih bakterijah največkrat zasledimo mutacije v genih *ompA*, *ompC* in *ompF*, ki kodirajo porine zunanje membrane. To so nespecifične membranske črpalke, ki se bodisi izražajo neprestano ali pa so uravnane z različnimi regulatornimi sistemi. Pri *E. coli* je najpomembnejša pri črpanju kinolonov iz celice črpalka AcrAB-TolC, ki ima številne regulatorje. Mutacija v genu *acrR*, ki je represor sistema *acrAB* občutno zveča aktivnost črpalke in s tem rezistenco proti kinolonom (Jacoby, 2005; Wang in sod., 2001).

2.7.2.2 Plazmidno kodirana rezistenca proti kinolonom- PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance)

Prvi primer plazmidno kodirane rezistence proti kinolonom so Martinez-Martinez in sodelavci opisali leta 1998. Šlo je za izolat *Klebsiella pneumoniae* iz Združenih držav Amerike z zapisom *qnr*. Do danes poznamo že tri mehanizme rezistenc, ki jih posredujejo zapisi na plazmidih. Prvi je rezistenca z zaščito tarčnega mesta, drugi rezistenca s kemijsko modifikacijo kinolonov, tretji mehanizem pa je izločanje antibiotika z membransko črpalko (Poirel in sod., 2008). Pojem rezistenca pri PMQR pomeni kakršenkoli dvig v MIC, gre torej za biološko in ne medicinsko definicijo, kjer je rezistenca definirana kot dvig MIC nad določeno mejo (CLSI- standard) (Robicsek in sod., 2006a).

2.7.2.2.1 PMQR- rezistenca z zaščito tarčnega mesta

Prvo PMQR determinanto so najprej poimenovali *qnr*, kasneje pa preimenovali v *qnrA*. Gen *qnrA* kodira protein QnrA dolg 218 aminokislin, ki spada v družino proteinov s ponovitvami petih aminokislin (Martinez-Martinez in sod., 1998). QnrA deluje tako, da se veže na vse štiri podenote encima DNA-giraze ali topoizomeraze IV, še preden se ta veže na verigo DNA. Ob vezavi pride do konformacijske spremembe žepa za vezavo kinolona, zato se kinoloni ne morejo približati mestu, kjer sicer delujejo. V primeru vezave proteina

Qnr na kompleks DNA-giraza-kinolon se ta destabilizira (Tran in sod., 2005a, 2005b; Tran in Jacoby, 2002).

QnrA omogoča klinično rezistenco proti nalidiksični kislini, ne pa tudi proti fluorokinolonom. Transkonjugantam z genom *qnrA* se MIC za fluorokinolone poveča do 20-krat (Wang in sod., 2004). Raziskave na izolatih, rezistentnih proti fluorokinolonom ter z genom *qnrA*, so pokazale, da imajo kromosomske in plazmidno kodirane determinante za rezistenco proti kinolonom, kadar se pojavljajo skupaj, dodatne učinke (Mammeri in sod., 2005). Mutacije v genih *gyrA*, *gyrB*, genih za membranske črpalke in porine lahko povečajo stopnjo rezistence, ki jo posredujejo plazmidi (Martinez-Martinez in sod., 2003). S tem lahko razložimo višje MIC pri kliničnih izolatih v primerjavi z njihovimi *qnr* pozitivnimi transkonjugantami (Nordmann in Poirel, 2005).

Leta 2003 so na Japonskem pri sevu bakterije *Shigella flexneri* izolirani pri zastrupitvi s hrano našli novo različico gena *qnr*. Poimenovali so jo *qnrS*. Produkt gena je 218 aminokislin velik protein, ki se s proteinom QnrA1 ujema v 59-odstotkih aminokislin (Hata in sod., 2005).

Leta 2006 so Jacoby in sodelavci opisali novo različico gena *qnr* imenovano *qnrB*, ki so ga našli v Indiji pri izolatu *K. pneumoniae*. Produkt gena je protein iz 226 aminokislin, ki se z različico QnrA1 ujema v 40-odstotkih, s QnrS1 pa v 37-odstotkih aminokislin. Danes je znanih pet različic gena *qnrA* (A1-A5), pet različic gena *qnrB* (B1-B5) in dve različici gena *qnrS* (S1-S2) (Robicsek in sod., 2006). Wang in sodelavci so leta 2008 opisali novo različico gena *qnr*, ki so jo poimenovali *qnrC*. Našli so ga pri kliničnem izolatu *Proteus mirabilis*. Protein QnrC sestavlja 178 aminokislin, s proteini QnrA1, Qnr B1 in Qnr S1 pa se ujema v 67.6 %, 48.0 % in 63.1 % aminokislin.

Raznolikost med geni *qnr* je najverjetneje mogoča zato, ker je za delovanje pomembna proteinska struktura in ne encimska aktivnost proteina. Če bi bila za delovanje pomembna encimska aktivnost bi namreč pričakovali mnogo večjo ohranjenost aminokislin (Robicsek in sod., 2006). Vsi Qnr proteini spadajo v družino proteinov s ponovitvami petih aminokislin in delujejo na podoben način (Nordmann in Poirel, 2005).

Plazmidi, ki nosijo gene *qnr* so zelo raznolikih velikosti in imajo prisotne gene za različne rezistence. Za večino teh plazmidov je značilno, da nosijo zapis za multiple rezistence. Gena *qnrA* in *qnrB* sta prisotna kot del kompleksa podobnega integronu tipa *sull* (Robicsek in sod., 2006) Gen *qnrS* pa leži ob transpozonu Tn3, ki vsebuje *bla*_{TEM-1} (Hata in sod., 2005).



Slika 1: Lega gena *qnrS*. Na sliki je prikazan fragment nastal po restrikciji plazmida pAH0376 z encimom *EcoR*I. Označena sta gena *qnrS* in *bla*_{TEM-1}. Preostala dva pravokotnika prikazujeta gen za resolvazo (*tnpA*) in transpozazo (*tnpR*). Trikotnika prikazujeta 38-bp dolgi obrnjeni ponovitvi na obeh straneh transpozona podobnega Tn3 (Hata in sod., 2005).

V raziskavi, ki se je ukvarjala z izvorom gena *qnrA*, so na prisotnost tega gena z verižno reakcijo s polimerazo testirali mnogo klinično pomembnih bakterij in tudi bakterij iz narave. Pri *Shewanella algae*, bakteriji iz sladkih in slanih voda, so našli kromosomsko kodirane QnrA proteine, ki so jih poimenovali QnrA3, QnrA4 in QnrA5. Ti proteini se od plazmidno kodiranega QnrA1 razlikujejo v le nekaj aminokislinah (Poirel in sod., 2005).

Raziskovalci predpostavljajo, da v naravi protein Qnr ščiti bakterije pred naravnimi inhibitorji DNA-giraze, kot je na primer mikrocin B17. Zaradi pogoste uporabe kinolonov in posledično močnega selekcijskega pritiska so prešli na mobilne genetske elemente in se razširili v različnih okoljih (Ellington, 2006).

Robicsek in sod. so leta 2006 objavili obsežen pregled razširjenosti genov *qnr*. Gen *qnrA* so do tega leta našli pri kliničnih izolatih na vseh naseljenih kontinentih razen v južni Ameriki. Našli so ga pri večini klinično pogostih enterobakterijah: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* in *Providencia stuartii*. Do takrat gena *qnrA* še niso zasledili pri bakteriji *Proteus* spp. in klinično pomembnih izvenčrevesnih bakterijah (kot sta *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter* spp.). Odsotnost gena pri teh

bakterijah je najverjetneje posledica premalo testiranih sevov. Gen *qnrS* so odkrili pri izolatu *Shigella flexneri* na Japonskem, njegovo različico *qnrS2* pa pri izolatu *Salmonella anatum* v Združenih državah Amerike. Gen *qnrS* so našli tudi v Vietnamu, Franciji in Španiji. Gen *qnrB* so našli pri bakterijah *Citrobacter koseri*, *K. pneumoniae*, *E. coli* in *E. cloacae* (Robicsek in sod., 2006a). Do leta 2008 pa so Minarini in sodelavci (2008) gene *qnr* zasledili tudi v južni Ameriki. Ob preverjanju prisotnosti PMQR determinant pri proti nalidiksični kislini rezistentnih izolatih iz Braziliije so pri 2,3% izolatov na plazmidih odkrili gen *qnrS*.

2.7.2.2.2 PMQR- rezistenca s kemijsko modifikacijo kinolonov

Odkrili so, da nekateri plazmidi *E. coli*, ki imajo gen *qnrA*, posredujejo 3 do 4-krat višjo rezistenco proti ciprofloksacinu, kot jo navadno omogoča protein QnrA. Ker ta pojav ni bil posledica večjega izražanja proteina, niti večjega števila kopij plazmida, so s pomočjo insercijske mutagenoze odkrili zapis, ki je odgovoren za dodaten porast rezistence. Po analizi nukleotidnega zaporedja so opisali novo različico gena za aminoglikozidno acetiltransferazo (*aac(6')-Ib*), ki so jo označili kot gen *aac(6')-Ib-cr* (cr-ciprofloksacin resistant). Njena posebnost sta mutaciji v kodonih 102 in 179 ter dodatni odsek dvanajstih baznih parov na 5' koncu gena. Tako spremenjena aminoglikozidna acetiltransferaza, lahko kemijsko spremeni fluorokinolone in bakterijski celici omogoča rezistenco proti nizkim koncentracijam teh protimikrobnih učinkovin (Robiczek in sod., 2006b).

Poznamo več kot 30 različic gena *aac(6')-Ib*, vse kodirajo aminoglikozidne acetiltransferaze, ki s prenosom acetilne skupine na dušikov atom aminoglikozidov, kot so kanamicin, amikacin in tobramicin, onemogočajo njihovo aktivnost. Zaradi spremembe v omenjenih dveh kodonih pri različici *aac(6')-Ib-cr* se je pojavila dodatna encimska aktivnost. Produkt tega gena je sposoben acetilacije fluorokinolonov kot sta ciprofloksacin in norfloksacin na dušikovem atomu piperazinilne substituenta na mestu 6. Na ta način inaktivira le kinolone pri katerih je piperazinilna skupina prisotna, proti ostalim kinolonom pa ne kaže nobene aktivnosti (Robiczek in sod. 2006b).

Mutaciji v omenjenih dveh kodonih povzročita dvig minimalne inhibitorne koncentracije fluorokinolonov recipientskega seva *E. coli* za 3 do 4-krat. Če pa je mutacija prisotna le na

enem od obeh kodonov pa se MIC dvigne le za dvakrat. Stopnja rezistence, ki jo produkt gena *aac(6')-Ib-cr* posreduje je nizka, vendar podobno kot Qnr, omogoča lažje preživetje pri mejnih koncentracijah protimikrobne učinkovine, pri katerih se pojavljajo mutacije na kromosomu. Tako se lahko pojavijo bolj rezistentne mutante. Posledica pridobitve nove aktivnosti produkta gena *aac(6')-Ib-cr* pa je zmanjšana učinkovitost inaktivacije aminoglikozidov. MIC pri kanamicinu se zmanjša na četrtno prvotne, pri tobramicinu in amikacinu pa na polovico. Le pri slednjem pride do izgube rezistence proti klinični koncentraciji antibiotika (Robicsek in sod., 2006b).

Gen *aac(6')-Ib-cr* je prvi primer gena, ki je ob tako majhni razliki v nukleotidnem zaporedju sposoben selektivne modifikacije protimikrobnih učinkovin iz dveh različnih skupin, od katerih je ena popolnoma sintetična. Prvič so spremenjeni gen izolirali Wang in sodelavci (2003) na Kitajskem. Našli so ga pri kar polovici multirezistentnih sevov bakterije *E. coli* izoliranih med leti 2000-2001. Kmalu zatem je bil gen opisan še na 92-kilobaz velikem plazmidu, ki so ga našli pri sevih *E. coli* izoliranih na različnih krajih v Severni Ameriki (Wang in sod., 2004; Boyd, 2004).

Robicsek in sodelavci (2006b) so preverjali prisotnost gena *aac(6')-Ib-cr* pri zbirki proti kinolonom rezistentnih *E. coli*, ki so imele tudi gen *qnrA*. Ugotovili so, da je prisoten pri dveh tretjinah teh sevov. Za primerjavo so preverili tudi prisotnost pri izolatih brez zapisa *qnrA*, kjer so ugotovili da je prisoten pri 50% sevov. Pogostost gena *aac(6')-Ib-cr* je kljub temu, da je bil odkrit kasneje, višja kot pogostost gena *qnrA*.

V Sloveniji so preverjali prisotnost divjega tipa in mutirane različice aminoglikozid acetiltransferaze pri uropatogenih ESBL bakterijah iz rodu *Klebsiella*, zbranih v letih 2000-2005 na IVZ Ljubljana. Pri 32 % sevov so odkrili zapis za mutirano različico encima, zapis za alel divjega tipa pa pri 43,7 % sevov. Zapis so s konjugacijami prenesli na transkonjugante. Pri transkonjugantah, ki se jim je glede na recipientski sev povečala MIC za ciprofloksacin, so odkrili gen *aac(6')-Ib-cr*, gena *aac(6')-Ib* pa niso odkrili pri nobeni izmed njih. Transkonjugantam z mutirano različico gena se je MIC dvignila za dva do 16-krat. O prisotnosti gena *aac(6')-Ib-cr* med *E. coli* v Sloveniji ni podatkov (Ambrožič in sod., 2007; Keber 2007).

2.7.2.2.3 PMQR- izločanje antibiotika z membransko črpalko

Nedolgo nazaj so Yamane in sodelavci (2007) opisali tretji plazmidno posredovan mehanizem rezistence proti fluorokinolonom. Pri kliničnem sevu *E. coli* C316, izoliranem leta 2002 na Japonskem, so na plazmidu pHPA odkrili gen *qepA* (*quinolone efflux pump*), ki omogoča rezistenco proti fluorokinolonom. Transkonjugantam se je zaradi prevzema gena *qepA* MIC za norfloksacin, ciprofloksacin in enrofloksacin (pogosto uporabljen kinolon v veterini) povišala vsaj za 32-krat. Analiza proteina QepA, zgrajenega iz 511 aminokislin, je pokazala veliko podobnost s transporterskimi membranskimi črpalkami iz družine proteinov s 14 transmembranskimi segmenti, ki so prisotni v aktinomicetah iz narave. Sevi z izraženim genom *qepA* so akumulirali bistveno manj norfloksacina kot sevi, kjer gen ni bil izražen. Če pa so bakterijam z izraženim genom *qepA* dodali inhibitor membranskih črpalk karbonil cianid m-klorofenilhidrazon (CCCP), se je akumulacija norfloksacina v celicah povečala. Iz zbranih podatkov so ugotovili, da je QepA membranska črpalka za izločanje fluorokinolonov.

Na plazmidu pHPA so v bližini gena *qepA* odkrili tudi gen *rmtB*, ki kodira 16SrRNA metilazo. Tudi ta protein kaže precejšnjo podobnost s 16SrRNA metilazami aktinomicet. Ti encimi aktinomicete varujejo pred negativnimi učinki aminoglikozidov, ki jih le te izločajo. Gena *qepA* in *rmtB* ležita v 10-kb regiji, ki jo na konceh obdajata dve kopiji IS26. Iz zbranih podatkov so Yamane in sodelavci (2007) sklepali, da gena *qepA* in *rmtB* izvirata iz aktinomicet in da sta bila skupaj mobilizirana v plazmid, ki se je kasneje prenesel v *E. coli*.

Membransko črpalko QepA so leta 2007 Perichon in sodelavci opisali pri kliničnem sevu *E. coli* izoliranem v Belgiji. Do danes so o prisotnosti *qepA* poročali še iz Kitajske, kjer so proučili zbirko 101 proti ceftiofurju rezistentnih sevov izoliranih iz domačih živali. PMQR determinante so odkrili pri kar 35 % izolatov, od tega so *qepA* zasledili pri skoraj 16 % sevov. Pri enem od sevov so odkril celo vse tri PMQR determinante. *qepA* so odkrili pri bakterijah *E. coli*, *K pneumoniae* in *E. cloacae*. Vsi izolati s PMQR determinantami, razen 9 nedefiniranih sevov, so izločali β -laktamaze CTX-M (Ma in sod., 2008). Cattoir in sodelavci (2008) so na 90 kb plazmidu *E. coli*, kliničnem izolatu iz Francije, odkrili zapis za različico membranske črpalke, ki so jo poimenovali QepA2. Yamane in sodelavci

(2008) so na Japonskem preverjali prisotnost genov *qepA* in *qnr* pri 751 kliničnih izolatih *E. coli*. Pri dveh sevih (0,3%) so našli gen *qepA*, genov *qnr* pa niso zasledili.

Dosedanje raziskave o razširjenosti gena *qepA* med kliničnimi izolati kažejo, da še ni zelo pogost. Vendar pa je to lahko zgolj posledica tega, da še ni bilo opravljenih zadosti raziskav. Zaskrbljujoč pa je predvsem podatek Ma in sodelavcev (2008) o razširjenosti PMQR determinant med domačimi živalmi.

2.8 SULFMETOKSAZOL TRIMETOPRIM

2.8.1 Delovanje sulfmetoksazol-trimetoprima

Sulfmetoksazol in trimetoprim sta bakteriostatična antibiotika, ki zavirata sintezo nukleinskih kislin. Sulfmetoksazol je sulfonamid, strukturni analog in kompetitivni antagonist paraaminobenzojske kisline (PABA). Inhibira normalno porabo PABA v sintezi folne kisline, pomembnega metabolita pri sintezi DNA, katerega bakterije ne morejo privzeti iz okolice. Sulfmetoksazol se veže na mesto za PABA na encim dihidropteroat sintetaza, s čimer prekine sintezo dihidropteroične kisline. Trimetoprim je diaminopiridin in analog dihidrofolne kisline. Zavira delovanje encima dihidrofolat reduktaza, ki sintetizira tetrahidrofolno kislino. Posledica delovanja obeh protimikrobnih učinkovin je prekinjena sinteza dihidropteroične in tetrafolne kisline, prekursorjev v sintezi purinov in pirimidinov. Učinkovini blokirata metabolizem folne kisline na različnih stopnjah. Z njuno sočasno uporabo izkoristimo sinergistično delovanje proti širokemu spektru mikroorganizmov. Ker človek nima te metabolne poti (folno kislino dobi s hrano), je zagotovljena selektivna toksičnost za bakterijske celice (Murray in sod., 1999; Silva 1996).

2.8.2 Mehanizmi rezistence proti sulfmetoksazol- trimetoprimu

Rezistenca proti sulfmetoksazol-trimetoprimu je posledica spremembe ali povečane sinteze dihidrofolat reduktaze, spremenjene propustnosti celice ali inaktivacije antibiotika. Pri nekaterih bakterijah se z mutacijo razvije nova metabolna pot, ki omogoči privzem folne kisline iz okolice. Pri enterobakterijah je najpogostejši mehanizem rezistence povečana sinteza na plazmidu kodiranega encima dihidrofolat reduktaze (Murray in sod., 1999; Silva 1996).

2.9 AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTIKI

Aminoglikozidi so skupina antibiotikov, za katere so značilne glikozidne vezi med aminosladkorji. Gre za baktericidne protimikrobne učinkovine s širokim spektrom delovanja. Vežejo se na 30S ribosomsko podenoto in s tem preprečijo translokacijo peptidil-tRNA iz mesta A na mesto P, prav tako pa povzročijo napačno prevajanje mRNA. Posledica je, da bakterija ne more sintetizirati proteinov (Tortora in sod., 2001).

Najbolj znan aminoglikozidni antibiotik je streptomycin, produkt bakterij iz rodu *Streptomyces*. Med aminoglikozidne antibiotike uvrščamo: amikacin, arbekacin, gentamicin, kanamicin, neomicin, netilmicin, paromomicin, streptomycin, tobramicin, rodostreptomycin in apramicin. Zaradi toksičnosti se večine teh antibiotikov ne uporablja pogosto. Ker se aminoglikozidi ne absorbirajo iz črevesa je potrebna intravenozna ali intramuskularna aplikacija. Uporabljajo se tudi v kremah (<http://en.wikipedia.org/wiki/Aminoglycosides>).

2.10 VIRULENTNI DEJAVNIKI

Virulenca je relativna sposobnost nekega organizma za povzročitev bolezni (http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/publikacije/katalogznanj/frame_v.htm). Virulenca je rezultat skupnega vpliva produktov enega ali večih genov za virulentne dejavnike, ki razlikujejo potencialnega patogena od komenzalnih črevesnih sevov (Johnson, 1991). Pri vstopu v sečila se uropatogene bakterije soočijo s pasivno in aktivno telesno obrambo, ki vključuje telesne pregrade, curek urina, protibakterijske molekule in imunske celice (Mulvey, 2002).

Virulentne dejavnike razdelimo v skupine glede na to v kateri stopnji patogeneze jih bakterija potrebuje. Za prvi stik z gostiteljem so pomembni adhezini, ki omogočijo pritrnitev na mestih povzročanja bolezni. Najprej je pritrnitev reverzibilna, nato sledi ireverzibilna pritrnitev, ki ji včasih sledi vstop v celice ali tvorba biofilmov. V naslednji stopnji še vedno sodelujejo adhezini, pridružijo pa se jim še toksini in invazini, ki s poškodbo gostiteljevega tkiva olajšajo prodiranje bakterije in raznašanje patogena po telesu. K preživetju patogena v gostiteljevem telesu pripomorejo še mehanizmi za privzem železa, ki ga v gostiteljevih tekočinah in tkivih primanjkuje, ter faktorji za izogib imunskemu sistemu gostitelja (Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

2.10.1 Adhezini

Najpogostejši adhezini uropatogenih sevov *E. coli* so fimbrije, najpogostejši tip so fimbrije tipa 1, ki so kodirane v osmih genih *fim*. Fimbrije tipa 1 so sestavljene iz dveh delov. Prvi del je fibrila sestavljena iz podenot FimA, drugi del pa je konica sestavljena iz proteinov FimH, FimG in FimF. Protein FimH je ključen za pritrjanje na receptorje gostiteljskih celic. FimH sodeluje tudi pri vezavi med bakterijami, pri njihovi agregaciji in tvorbi biofilmov. Prednost bakterij v biofilmu je, da so dodatno zaščitene pred imunskim sistemom in antibiotiki. Biofilmi, ki se tvorijo s pomočjo fimbrijev tipa 1, olajšajo poselitev katetrov in drugih medicinskih pripomočkov, kar predstavlja velik problem pri hospitaliziranih bolnikih (Mulvey, 2002). Fimbrije tipa 1 imajo vlogo tudi pri invaziji tkiv. Pritrditev bakterij preko fimbrij tipa 1 sproži spremembe na površini in v citoskeletu gostiteljske celice, ki posledično ovije pritrjeno bakterijo in ji omogoči vstop v celico. Znotraj celic pa so bakterije bolj zaščitene pred imunskim sistemom in antibiotiki in se tam lažje razmnožujejo (Martinez in sod., 2000).

Poznamo tudi nefimbrialne adhezine. Iha je adhezivni protein, ki je bil prvič opisan pri enterohemoragičnem sevu *E. coli* O157:H7. Iha je kateholatni sideroforni receptor, ki lahko v celice prevzema enterobaktin in sorodne spojine (Leveille in sod., 2006). Hra (»heat resistant agglutinin«) je proti vročini odporen protein zunanje membrane in nefibrilarni adhezini. Zleplja eritrocite in črevesne celice (Srinivasan in sod., 2003).

2.10.2 Toksini in invazini

Med toksine in invazine uvrščamo hemolizine, nekrotične faktorje, proteaze in še nekatere metabolite. Hemolitični sevi *E. coli* najpogosteje sintetizirajo in izločajo α -hemolizin. Sintezo in sekrecijo α -hemolizina omogočajo proteini zunanje membrane TolC in produkti štirih genov, kodiranih v *hly* operonu. Prvi je protein HlyA, protein s hemolitično funkcijo, ostali trije (HlyC, HlyB, HlyD) pa omogočajo njegovo aktivacijo in sekrecijo. α -hemolizin povzroči nastanek kationsko-selektivnih kanalov v membranah gostiteljskih celic. Posledica je vnetje, poškodba tkiva in oslabitev gostiteljevega imunskega sistema. α -hemolizin ponavadi izdelujejo močno virulentni sevi. Zapis za α -hemolizin je mnogokrat povezan z zapisom za citotoksični nekrotični faktor (Johnson, 1991; Bahrani-Mougeot in sod., 2002).

Citotoksični nekrotični faktor ali CNF1 je virulentni dejavnik, ki je pogosto povezan z okužbami sečil. CNF1 je protein, ki v mehurju povzroči luščenje uroepitelnih celic (Bahrani-Mougeot in sod., 2002)..

Enterohemolizin (kodiran z genom EHEC-*hlyA*) je virulentni dejavnik povezan s sevi *E. coli*, ki povzročajo hemoragični kolitis in hemolitični uremični sindrom. Zapis zanj se nahaja na velikem virulentnem plazmidu. Spada med citolizine, po primarni strukturi pa je podoben α -hemolizinu (Schmidt in sod., 1995).

E. coli lahko povzroči tudi meningitis. Za prečkanje krvno možganske pregrade ter naselitev v možganskem tkivu potrebuje mnogo virulentnih dejavnikov. Od fimbrij, ki omogočijo pritrditev, pa do invazinov, ki omogočijo prehod krvno možganske pregrade in invazijo možganskega tkiva. Med invazine spadajo protein OmpA, kapsula K1 ter produkti genov *ibeA* (invasin of brain endothelium), *ibeB*, *asIA* ter *yijP* (Huang in sod., 2000). Kapsula K1 je kodirana z gručo genov, v kateri je tudi gen *neuC*, ki je vključen v sintezo sialične kisline (Zapata in sod., 1992).

2.10.3 Dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu

Komplementni sistem je komponenta človeškega imunskega sistema. Gre za nabor molekul, ki v kaskadni reakciji sprožijo nastanek membranskega kompleksa (MAC-membrane attack complex). MAC napade membrano bakterij ter v njej tvori pore, kar povzroči lizo celic. Komplement sprožijo različni dražljaji, med drugim komponente celične stene bakterij. Drugi pogost način odstranjevanja bakterij je fagocitoza, pri kateri fagocitne celice obdajo in požrejo bakterijske celice, ki so označene s protitelesi (Johnson, 1991).

E. coli se imunskemu sistemu izogiba na več načinov in pri vseh sodelujejo različni izvencelični polisaharidi (lipopolisaharidna plast), kapsule ter posebni proteini. S kislimi polisaharidi in polisaharidi O ovirajo delovanje komplementa. Normalno delovanje kompleksa MAC pa onemogočata produkta genov *iss* (increased serum survival) in *traT* (Johnson, 1991). Fagocitozo bakterijskih celic ovirajo različne vrste kapsul. Pri *E. coli* je poznanih več kot 80 tipov kapsul, ki jih delimo v 3 skupine. Kapsule skupine 1 imajo navadno komenzalni črevesni sevi, kapsule skupin 2 in 3 pa so povezane z ExPEC sevi.

Kapsule iz skupine 2 so večinoma tanke in termostabilne, sestavljajo jih kisli polisaharidi z visoko koncentracijo anionov. Zapis zanje je na kromosomu bakterije in ga sestavljajo trije skupki genov (*kpsMT*) (Johnson, 1991).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

3.1.1.1 Laboratorijski sevi

Laboratorijska seva *E. coli*, ki smo ju uporabili pri delu (gl. preglednico 5), sta iz zbirke Katedre za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Preglednica 5. Laboratorijska seva *E. coli*, ki smo ju uporabili pri delu.

sev <i>E.coli</i>	genotip	vir
J53	Az ^r	G. A. Jacoby
J53/pMG252qnr	Az ^r	G. A. Jacoby

3.1.1.2 Klinični izolati ESBL producirajočih sevov

Pri delu smo uporabili klinične izolate uropatogenih ESBL producirajočih sevov *E. coli*. Sevi so bili zbrani v letih 2000-2007 v različnih zdravstvenih ustanovah (domovi starejših občanov, zdravstveni domovi, urološka ambulanta na polikliniki, bolnišnica Trbovlje, mestna otroška bolnišnica) in identificirani v Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) v Ljubljani.

Uporabili smo tudi klinične izolate ESBL producirajočih sevov *E. coli* zbranih in identificiranih v Zavodu za zdravstveno varstvo Murska Sobota (ZZV MS) v letih 2005-2007 in v Bolnišnici Golnik v letih 2000-2007. Uporabili smo tudi zbirko šestih ESBL producirajočih sevov zbranih v Bolnišnici Golnik, ki niso *E. coli*.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB (0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 1-odstotni tripton, 1-odstotni NaCl). Po 10 ml raztopljenega gojišča smo odpipetirali v epruvete in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C.

3.1.2.2 Priprava trdnih gojišč LB v petrijevkah

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55°C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.2.3 Priprava trdnih gojišč LB z dodanim protimikrobnim sredstvom

Osnovno gojišče smo pripravili tako, kot je opisano v odstavku 3.1.2.2. Na približno 55°C ohlajenemu gojišču smo sterilno dodali željeno protimikrobno sredstvo, do končne koncentracije, ki je navedena v preglednici 6.

Preglednica 6. Založne in končne koncentracije protimikrobnih sredstev v gojišču LB.

protimikrobno sredstvo	založna konc. (mg/ml)	končna konc. (µg/ml)
natrijev azid	150	175
ciprofloksacin	10	0,04
ampicilin	100	100
tetraciklin	10	10
trimetoprim	10	10

3.1.2.4 Priprava trdnih gojišč BHI (Brain Heart Infusion)

Za pripravo trdnih gojišč BHI smo v deionizirani vodi raztopili 37 g/l gojišča BHI in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55°C, smo ga nalili v plastične petrijevke.

3.1.3 Kemikalije

AB BIODISC

- ❖ Etest-ciprofloksacin

BIOCHEMICA

- ❖ ciprofloksacin

BIOLIFE ITALIANA

- ❖ agar (agar tehcnical)

- ❖ BHI (brain hearth infusion)

BIO-RAD

- ❖ SDS
- ❖ Genepath Group 6 Reagent Kits

FERMENTAS

- ❖ PCR Master Mix (0,05 enot/ μ l Taq DNA polimeraze v reakcijskem pufu: 4 mM MgCl₂, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))
- ❖ standardna DNA lestvica 1 kb
- ❖ DNA lestvica 1 kb Plus DNA Ladders
- ❖ standardna DNA lestvica 50 bp
- ❖ destilirana voda brez nukleaz
- ❖ nanašalni elektroforezni puffer
- ❖ DNA velikostni standardi (1 kb DNA Ladders, 1 kb Plus DNA Ladders, 50 bp DNA Ladders)

KEMIKA

- ❖ glukoza
- ❖ EDTA
- ❖ ledocetna kislina

LEK

- ❖ tetraciklin

MERCK

- ❖ izopropanol
- ❖ 96-odstotni etanol
- ❖ kloroform
- ❖ fenol
- ❖ izoamilalkohol

QIAGEN

- ❖ komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela QIAquick Gel Extraction kit

RIEDEL DE HAËN

- ❖ borova kislina

ROTH

- ❖ baza Tris

SEAKEM

- ❖ agarosa

SIGMA

- ❖ etidijev bromid (10 mg/ml)
- ❖ LB (Luria-Broth medium)
- ❖ natrijev azid
- ❖ natrijev hidroksid
- ❖ kalijev acetat
- ❖ 0,1 M kalcijev diklorid
- ❖ trimetoprim
- ❖ ampicilin

3.1.4 Encimi

FERMENTAS

- ❖ *TaaI*
- ❖ *NdeI*
- ❖ *PstI*
- ❖ Fast digest® *PstI*
- ❖ *XbaI*

3.1.5 Pufri in reagenti

3.1.5.1 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabili:

- ❖ **5X TBE** (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi,
- ❖ agarozo za pripravo gela
- ❖ **nanašalni elektroforezni pufer** (0,25-odstotni bromfenolmodro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza).

3.1.5.2 Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo

Pri izolaciji plazmidne DNA z alkalno hidrolizo smo uporabljali naslednje raztopine:

- ❖ **raztopina I** (50 mM glukoza, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA), ki smo jo umerili na vrednost pH 8, avtoklavirali 15 minut pri 121°C in do uporabe hranili pri 4°C,
- ❖ **raztopina II** (0,2 N NaOH, 1-odstotni SDS), ki smo jo pripravili tik pred uporabo,
- ❖ **raztopina III** (60 ml 5 M kalijevega acetata, 11,5 ml ledocetne kisline, 28,5 ml destilirane vode), ki smo jo avtoklavirali 15 minut pri 121°C in do uporabe hranili pri 4°C,
- ❖ **raztopina FKI** (fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1),
- ❖ **kloroform**,
- ❖ **96-odstotni etanol**,
- ❖ **70-odstotni etanol**,
- ❖ **pufer TE z RNazo** (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza).

3.1.6 Oprema

Pri delu smo uporabili naslednjo opremo:

- ❖ stresalnik (Infors HT),
- ❖ ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer),
- ❖ namizno centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5417C),
- ❖ sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma)
- ❖ avtomatske pipete (Eppendorf),

- ❖ namizno centrifugo (Beckman),
- ❖ centrifugo (Sorval),
- ❖ rotacijski stresalnik (Biofuge 13, Heraeus),
- ❖ vibracijski mešalnik (SBD).

3.2 METODE

3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.2.1.1 Priprava vzorčne DNA za izvedbo PCR

1 cepilno zanko bakterijske kulture smo prenesli iz trdnega gojišča v mikrocentrifugirke in dodali 200 µl sterilne destilirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Nato smo resuspendirane celice segrevali 10 minut v vreli vodi in jih centrifugirali 10 minut pri 14.000 vrt./min v namizni centrifugi pri sobni temperaturi. Supernatant, v kateri je celokupna celična DNA, smo uporabili kot vzorčno DNA pri polimerazni verižni reakciji.

3.2.1.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

V preglednici 7 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje delov genov s PCR.

Preglednica 7. Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost produkta, ki nastane pri PCR.

oznaka začetnega oligonukleotida	nukleotidno zaporedje (5'-3')	velikost PCR pomnožka (bp)
QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a	264
QnrBm-R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA ^a	
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
QepA-F	GCGAGCGCTGGGCGCTTGCGCAG	1521
QepA-R	CCGCCACGCTCCACGACACCGC	
qac 1 (F)	GGCATCACTGCGTGTTGCTCG	514
qac 2 (R)	GACTGAGCATGACCTTGCG	
PANCTX-M.F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	543
PANCTX-M.R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	
CTX.F	AAAAATGATTGAAAGGTGGTTGT	1029
CTX.R	TTACAGCCCTTCGGCGATGA	
CTXM.I.F3	GACGATGTCACTGGCTGAGC	499
CTXM.I.R2	AGCCGCCGACGCTAATACA	
CTXM.II.TOHO1.2.F	GCGACCTGGTAACTACAATCC	351
CTXM.II.TOHO1.1.R	CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC	

oznaka začetnega oligonukleotida	nukleotidno zaporedje (5'-3')	velikost PCR pomnožka (bp)
CTXM8.WSIII.F	AGACCTGATTA ACTACAATCCCATTA	516
CTXM8.WSIII.R	ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC	
CTXM914.IV.F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	474
CTXM914.IV.R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG	
OXA-1A	CCAAAGACGTGGATG	442
OXA-1R	GTAAATTCGACCCCAAGTT	
SHV.F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	927
SHV.R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
TEM.F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1079
TEM.R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
DHA-1A	CTGATGAAAAAATCGTTATC	
DHA-1B	ATT CCA GTG CAC TCA AAA TA	
ChuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
ChuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
YjaA1	TGAAGTGT CAGGAGACGCTG	211
YjaA2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4.C2-1	GAGTAATGT CGGGGCATTCA	152
TspE4.C2-2	CGCGCCAACAAGTATTACG	
FimH1	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	465
FimH2	ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	
Iha1	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827
Iha2	TCCTTAAGCTCCC GCGGCTGA	
Hra 1	TACGGTATTCAGTGGCGGTATC	474
Hra 2	TCGTCCTTGTA ACTCACACTGC	
KpsMTIII1	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272
KpsMTIII2	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
Iss1	ACGATACTCCGTAGCCAGAGAT	791
Iss2	ATGAACAGTGCAGATGAGCTCC	
HlyA1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177
HlyA2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	
EHEC-HlyA1	GGTGCAGAAAAAGTTGTAG	1551
EHEC-HlyA2	TCTCGCCTGATAGTGT TTGGTA	
CNF1.1	TCGTTATAAAATCAAACAGTG	445
CNF1.2	CTTTACAATATTGACATGCTG	
IbeA1	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170
IbeA2	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
NeuCA	GGTGGTACATTCCGGGATGTC	654
NeuCB	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	

^a-M = A ali C, H = A ali C ali T, Y = C ali T.

3.2.1.3 Sestava reakcijskih mešanic za reakcijo PCR

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS* (multipleks PCR) smo pripravili tako, da smo v 200 μ l mikrocentrifugirke odpipetirali 2 μ l bakterijskega lizata, po 1 μ l začetnih oligonukleotidov QnrAm-F, QnrAm-R, QnrBm-F, QnrBm-R, QnrSm-F, QnrSm-R (10 pmol/ μ l), 12,5 μ l PCR Master mix-a (Fermentas) in 4,5 μ l destilirane vode.

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2 (multipleks PCR) smo pripravili tako, da smo v 200 μ l mikrocentrifugirke odpipetirali 2 μ l bakterijskega lizata, po 1 μ l začetnih oligonukleotidov ChuA1, ChuA2, YjaA1, YjaA2, TspE4.C2-1, TspE4.C2-2, 12,5 μ l PCR Master mix-a (Fermentas) in 4,5 μ l destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* smo pripravili tako, da smo v 200 μ l mikrocentrifugirke odpipetirali 3 μ l bakterijskega lizata, 1 μ l začetnega oligonukleotida QepA-F (10 pmol/ μ l), 1 μ l QepA-R (10 pmol/ μ l), 12,5 μ l PCR Master mix-a (Fermentas) in 7,5 μ l destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *hlyA*, *kpsMTII*, *ibeA*, *qepA* in *iha* smo pripravili tako, da smo v 200 μ l mikrocentrifugirke odpipetirali 2,5 μ l bakterijskega lizata, 1 μ l izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/ μ l), 1 μ l izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/ μ l), 12,5 μ l PCR Master mix-a (Fermentas) in 8 μ l destilirane vode.

Reakcijske mešanice za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *fimH*, EHEC-*hly*, *hra*, *cnf*, *neuC*, *iss* in delov genov skupin β -laktamaz CTX, OXA, TEM, SHV, DHA in podskupin CTX smo pripravili tako, da smo v 200 μ l mikrocentrifugirke odpipetirali 1 μ l bakterijskega lizata, 1 μ l izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/ μ l), 1 μ l izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/ μ l), 12,5 μ l PCR Master mix-a (Fermentas) in 9,5 μ l destilirane vode.

3.2.1.4 Pogoji pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* s parom začetnih oligonukleotidov qac 1 (F)/ qac 2 (R)

začetna denaturacija	94°C	2,5 minut	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	40 sekund	
pomnoževanje	72°C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*

začetna denaturacija	95°C	4 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	54°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *kpsMTII*, *chuA*, *yjaA* in fragmenta TspE4.C2

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	30 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedja dela gena *hlyA*

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	64°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	1,5 minute	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *iha*, *fimH* in delov genov, ki kodirajo OXA, panCTX in CTX podskupine (razen s parom začetnih oligonukleotidov CTXM914.IV.F/ CTXM914.IV.R)

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	1 minuta	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja dela gena EHEC-*hly*

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	60°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	2 minuti	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *hra*, *ibeA*, *cnf*, *neuC* in *iss*

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	60°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	1 minuta	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov, ki kodirajo CTX in SHV

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	1,5 minute	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja dela gena, ki kodira TEM

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	50°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	80 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja dela gena, ki kodira DHA

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	2 minuti	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnega zaporedja dela gena, ki kodira CTX-M podskupino s parom začetnih oligonukleotidov CTXM914.IV.F/ CTXM914.IV.R

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	30×
prileganje začetnih oligonukleotidov	62°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	1 minuta	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Z elektroforezo na agaroznih gelih smo preverjali prisotnost in velikost nastalih PCR pomnožkov ter fragmentov DNA po restrikciji. Preverjali smo tudi prisotnost plazmidne DNA po izolaciji. Glede na analizo različne DNA smo pripravili gele z gostoto od 0,9 do 1,5-odstotka agaroze. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezni količini agaroze dodali puferski 1 X TBE ter segrevali dokler se agarozna ni popolnoma raztopila. Na približno 50 do 60°C ohlajenemu gelu smo dodali etidijev bromid do končne koncentracije v gelu 0,5 µg/ml. Gel smo nato vlili v nosilce in počakali, da se strdi.

Kot označevalec velikosti smo v jamice dodali dodali 1-kilobazno ali 50-bp lestvico (Fermentas). V jamice smo vnesli po 5 μ l PCR pomnožkov ali PCR pomnožkov po restrikciji skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5:1. Elektroforeza je potekala pri napetosti 10V/cm gela v pufu 1 X TBE.

Za analizo razrezane plazmidne DNA za plazmidne profile smo uporabili 1 odstotni agarozni gel, kot označevalec velikosti smo uporabili 1-kilobazno lestvico (Plus DNA Ladders, Fermentas). V jamice smo vnesli vzorec in nanašalni pufer v razmerju 20:1. Ločevali smo pri napetosti 6 V/cm gela, v pufu 1 X TBE.

Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb DNA Ladders, Fermentas) zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250. Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb Plus DNA Ladders, Fermentas) zasledimo fragmente sledeče velikosti : 20000, 10000, 7000, **5000**, 4000, 3000, 2000, **1500**, 1000, 700, **500**, 400, 300, 200 in 75 bp. Po elektroforezi 50 bp lestvice pa so fragmenti veliki 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 in 50 bp.

Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in slikali.

3.2.3 Ugotavljanje filogenetskih skupin in podskupin ESBL producirajočih sevov *E. coli*

Seve smo uvrstili v filogenetske skupine in podskupine na osnovi prisotnosti treh odsekov DNA: *chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2, kot je prikazano v preglednici 1.

3.2.4 Restriksijska analiza PCR pomnožkov

3.2.3.1 Restriksijska analiza PCR pomnožkov dobljenih s parom začetnih oligonukleotidov qac1/qac2.

S parom začetnih oligonukleotidov qac1/qac2 smo pomnožili gen *aac(6')-Ib*, prav tako pa tudi mutirano različico gena, to je *aac(6')-Ib-cr*. Zaporedji genov se razlikujeta le v dveh baznih parih v kodonih 102 in 179. Z izbranimi restriksijskima encimoma *TaaI* in *NdeI*, ki imata spoznavni sekvenci tudi na mestih, kjer sta mutaciji, smo razrezali nastale PCR

pomnožke. Glede na velikost nastalih fragmentov smo določili prisotnost izvorne in/ali mutirane oblike gena.

Za pripravo 10 μ l restrikcijske mešanice smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 3 μ l neočiščenega PCR pomnožka, 0,5 μ l encima *TaaI* ali 1 μ l encima *NdeI*, 1 μ l ustreznega pufru za restrikcijo (Fermentas) ter dopolnili z deionizirano vodo do 10 μ l. Restrikcija z encimom *TaaI* je potekala pri 65°C, restrikcija z encimom *NdeI* pa pri 37°C. Obe restrikciji smo inkubirali približno 16 ur. Produkta restrikcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5-odstotnem agaroznem gelu.

3.2.5 Ugotavljanje rezistence proti antibiotikom

Podatke o rezistenci proti antibiotikom smo dobili iz IVZ Ljubljana, ZZV Murska Sobota in Bolnišnice Golnik.

3.2.6 Čiščenje fragmenta dobljenega v reakciji PCR in določitev nukleotidnega zaporedja

Z metodo PCR smo ugotovili, da je v enem izmed sevov prisoten fragment *qnrS*, našli pa smo tudi zapis β -laktamaze iz skupine CTX-M. Da bi se prepričali, da ne gre za nespecifičen pomnožek, smo fragmente očistili in jim določili nukleotidno zaporedje. PCR reakcijo smo ponovili po že prej opisanem postopku (gl. 3.2.1.3 in 3.2.1.4), le da smo pripravili dvojno količino mešanice za PCR. Po pomnoževanju smo celotno vsebino pomnožkov (50 μ l) nanesti v jamice na agaroznem gelu ter po elektroforezi iz gela izrezali del, kjer se je nahajal pomnoženi fragment DNA. Nato smo s pomočjo kompleta QIAquick PCR Purification Kit očistili iskane fragmente. Čiščenje DNA iz agaroznega gela smo izvedli tako, kot piše v navodilih kita. Očiščene fragmente smo poslali na sekvenciranje v Microsynth-Balgach (Švica).

3.2.7 Določanje restrikcijskega profila izbranih ESBL producirajočih sevov *E. coli*

3.2.7.1 Izolacija in restrikcija genomske DNA

Celokupno DNA izbranih ESBL producirajočih izolatov iz IVZ Ljubljana so očistili in popolnoma razrezali z encimom *XbaI* v Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije. Uporabili so komplet Genepath Group 6 Reagent Kits (Bio-Rad).

3.2.7.2 Elektroforeza v pulzirajočem polju

Popolnoma razrezano celokupno DNA izbranih sevov so v IVZ Republike Slovenije ločili z elektroforezo v pulzirajočem polju. Z analizo restrikcijskega profila smo na podlagi podobnosti seve razvrstili v skupine.

Elektroforeza v pulzirajočem polju ali PFGE (pulse field gel electrophoresis) je metoda s katero ločujemo velike fragmente DNA. Standardna gelska elektroforeza namreč ne omogoča ločevanje DNA fragmentov večjih od 15-20 kb, saj se ti združijo in potujejo skupaj. Elektroforeza v utripajočem polju je podobna standardni, le da električno polje ni stalno, temveč se periodično spreminja v treh smereh. Prva smer ja centralna, drugi dve osi pa sta zamaknjeni za 120 stopinj. Časi posameznih pulzov so enaki, kar celokupno povzroči, da se DNA pomika v eni smeri. Metoda je primerna za ločevanje fragmentov, ki so dolgi do 2 Mb. Metoda je dolgotrajnejša od standardne gelske elektroforeze.

3.2.8 Konjugacija ESBL producirajočih sevov z *E. coli* J53 Az^r

Konjugacije smo naredili tako, da smo na trdno gojišče BHI na gosto razmazali polno cepilno zanko proti natrijevemu azidu rezistentnega recipientskega seva *E. coli* J53 Az^r, prek katerega smo na enak način razmazali posamezne donorske seve (ESBL producirajoče seve iz zbirk). Plošče smo inkubirali prek noči pri 37°C. Naslednji dan smo polno zanko zraslih bakterij precepili na trdna selektivna gojišča LB z natrijevim azidom (za kontraselekcijo proti donorju), v kombinaciji z ampicilinom, tetraciklinom ali trimetoprimom (za selekcijo transkonjugant). Plošče smo inkubirali 2 dni pri 37°C., nato smo kolonije z ezo precepili na enaka sveža gojišča in zopet inkubirali 2 dni pri 37°C. Precepljanje smo ponovili še enkrat.

Za preverjanje transkonjugant smo poleg selekcije z antibiotiki uporabili tudi metodo PCR. Pri vseh transkonjugantah smo po že opisani metodi PCR preverili kateri filogenetski skupini pripadajo. V primeru, da je bila filogenetska skupina domnevnih transkonjugant enaka filogenetski skupini recipientskega seva *E. coli* J53 Az^r smo potrdili, da gre za transkonjuganto.

3.2.9 Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri transkonjugantah

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) smo ugotavljali tako, da smo kulture transkonjugant in recipienta z vatirano palčko enakomerno nanесли na plošče trdnega gojišča LB. Na sredino gojišča smo nato položili trakove z gradientom koncentracije ciprofloksacina (Etest), ter plošče inkubirali preko noči pri 37°C. Naslednji dan smo po navodilih proizvajalca na trakovih odčitali ustrezne vrednosti MIC.

3.2.10 Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant

3.2.10.1 Izolacija plazmidne DNA transkonjugant z alkalno hidrolizo (po prirejenem protokolu).

V osnovnem protokolu izolacije plazmida z alkalno lizo je zapisano, da se kot izhodno kulturo za izolacijo uporabi 10 ml prekonočne tekoče bakterijske kulture. Zaradi lažje izvedbe in pomanjkanja laboratorijskih pripomočkov (velikih centrifugirk) smo protokol priredili.

Transkonjugante smo nacepili na trdna gojišča LB z dodanimi antibiotiki (ampicilin in/ali tetraciklin) ter jih inkubirali preko noči pri 37°C. Polno cepilno zanko bakterijske kulture (60-80 mg) smo nato resuspendirali v 200 μ l raztopine I. Suspenziji celic smo dodali 4 μ l lizocima v vodi (50 mg/ml), narahlo premešali in inkubirali deset minut pri sobni temperaturi, da so celice lizirale. K lizatu smo najprej dodali 400 μ l sveže pripravljene raztopine II, nato pa še 300 μ l ledeno hladne raztopine III, vsakič rahlo premešali z obračanjem nato pa mikrocentrifugirke inkubirali 5 minut v ledeni vodni kopeli. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 12.000 vrt./min pri 4°C. Po ločitvi faz smo približno 600 μ l vodne faze prenesli v svežo mikrocentrifugirko in jo ponovno centrifugirali 5 minut pri 12.000 vrt./min pri 4°C. Tako smo popolnoma oborili ostanke proteinov in celične stene. Zgornjo vodno fazo smo odpipetirali v svežo mikrocentrifugirko in ji dodali enako količino mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol. Zmes smo na kratko vorteksirali in centrifugirali 2 minuti pri enakih pogojih. Supernatantu smo dodali enako količino kloroforma, ter postopek ponovili. Plazmidno DNA v zgornji vodni fazi smo oborili z dvakratnim volumnom 96-odstotnega etanola pri sobni temperaturi. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 12.000 vrt./min in 4°C. Po centrifugiranju smo odstranili s pipeto,

oborini DNA pa dodali 1 ml 70-odstotnega etanola. Centrifugirali smo deset minut pri enakih pogojih nato pa etanol popolnoma odstranili s pipeto. Oborjeno plazmidno DNA smo sušili 20 minut, da je ves alkohol izhlapel, posušeno oborino pa raztopili v 30 μ l pufru TE z RNA-zo. Količino plazmidne DNA smo preverjali tako, da smo pripravili 10 μ l restrikcijske mešanice (1 μ l pufru za restrikcijo, 1 μ l encima Fast digest *Pst*I, 3 μ l izolirane plazmidne DNA in 5 μ l deionizirane vode), jih inkubirali 10 minut v topli kopeli na 37°C, nato pa nanесли z nanašalnim pufrom na 1% agarozni gel in ločevali pri napetosti 6 V/cm gela, v pufru 1 X TBE. Glede na količino izolirane plazmidne DNA smo določili količino DNA, ki smo jo kasneje uporabili za popolno restrikcijo.

3.2.10.2 Popolna restrikcija izoliranih plazmidov in analiza vzorcev dobljenih fragmentov

Za pripravo 25 μ l restrikcijskih mešanic smo v mikrocentrifugirke odpipetirali po 12 do 20 μ l izolirane plazmidne DNA (odvisno od koncentracije), 2,5 μ l restrikcijskega encima Fast digest *Pst*I (Fermentas), 2,5 μ l ustreznega pufru za delovanje encima (Fermentas) ter dodali deionizirano vodo do skupnega volumna 25 μ l. Restrikcijske mešanice smo premešali in jih inkubirali 1 uro in 20 minut v vodni kopeli segreti na 37°C. Restrikcijske mešanice smo z nanašalnim pufrom (razmerje 20:1) nanесли na 1-odstotni agarozni elektroforezni gel. Kot merilo velikosti smo uporabili 1-kb lestvico (1 kb Plus DNA Ladders). Elektroforeza fragmentov je potekala približno 18 ur pri 5V/cm gela v pufru 1 X TBE.

4 REZULTATI

4.1 ZBIRKA SEVOV ESBL

Pri delu smo uporabljali tri zbirke ESBL producirajočih izolatov bakterij. Prva zbirka (gl. preglednico 8) iz Bolnišnice Golnik obsega 17 izolatov, 7 izmed njih niso *E. coli*. Druga zbirka (gl. preglednico 9) iz ZZV Murska Sobota vključuje 22 izolatov bakterije *E. coli*, tretja pa je zbirka 57 izolatov uropatogenih *E. coli*, ki so jih osamili in identificirali v IVZ Ljubljana, zbrali pa v različnih zdravstvenih ustanovah (gl. preglednico 10). V teh preglednicah so navedeni tudi podatki, ki so nam jih posredovale zdravstvene ustanove, v katerih so seve identificirali.

Preglednica 8: Zbirka sevov ESBL iz Bolnišnice Golnik. Navedeni so podatki o delovni oznaki sevov, letu izolacije, pacientu, viru kužnine in vrsti bakterije.

del. oz.	leto izolacije	pacient (šifrirano)	vir kužnine	vrsta bakterije
1g	2006	I	rana	<i>E. coli</i>
2g	2006	II	urin	<i>E. coli</i>
3g	2007	III	izmeček	<i>E. coli</i>
4g	2007	IV	urin	<i>E. coli</i>
5g	2007	V	urin	<i>E. coli</i>
6g	2007	VI	urin	<i>E. coli</i>
7g	2007	VII	urin	<i>E. coli</i>
8g	2000	VIII	dihala	<i>E. coli</i>
9g	2000	IX	rana	<i>E. coli</i>
10g	2000	X	urin	<i>E. coli</i>
7Ah	np	np	np	<i>Aeromonas hydrophila</i>
8Sm	np	n p	np	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
9Sm	np	np	np	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
10Sm	np	np	np	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
11Pm	np	np	np	<i>Proteus mirabilis</i>
17Ab	np	np	np	<i>Acinetobacter baumannii</i>

del. oz.- delovna oznaka, ki smo jo uporabljali pri delu; pacient (šifrirano)- ista šifra pomeni istega pacienta, np- ni podatka

Preglednica 9: Zbirka sevov *E. coli*, ki izločajo ESBL, zbrane v ZZV Murska Sobota. Poleg delovne oznake so napisani še podatki o letu izolacije seva, pacientu, viru kužnine in podatki o hospitalizaciji bolnika.

del. oz.	leto izolacije	pacient (šifrirano)	vir kužnine	hospitalizacija
MS 1	2007	*1	urin	NE
MS 2	2005	*2	urin	DA
MS 3	2005	*3	blato	DA
MS 4	2005	*4	blato	NE
MS 5	2005	*5	urin	NE
MS 6	2005	*6	urin	NE
MS 7	2005	*7	urin	DA
MS 8	2005	*8	urin	DA
MS 9	2005	*9	urin	NE
MS10	2005	*10	urin	DA
MS 11	2005	*11	urin	DA
MS 12	2005	*12	urin	NE
MS 13	2005	*13	urin	DA
MS 14	2007	*14	blato	DA
MS 15	2006	*15	kri	DA
MS 16	2007	*16	kri	DA
MS 17	2006	*17	kri	DA
MS 18	2007	*18	urin	DA
MS 19	2007	*19	urin	NE
MS 20	2007	*20	urin	NE
MS 21	2007	*21	urin	DA
MS 22	2007	np	np	np

del. oz.- delovna oznaka, ki smo jo uporabljali pri delu; pacient (šifrirano)- ista šifra pomeni istega pacienta; hospitalizacija- ali je bil pacient hospitaliziran ali ne; np- ni podatka

Preglednica 10: Zbirka sevov uropatogenih *E. coli*, ki izločajo ESBL, iz Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana. Navedeni so delovna in originalna oznaka seva, leto izolacije, pacient in ustanova kjer je bil vzorec odvzet.

del. oz.	leto izolacije	pacient (šifrirano)	odvzem vzorca
IS3341	2000	#1	DSO Komanova
IS4452	2000	#2	ZD Šentvid
IS5017	2000	#3	DSO Tisje
IS5345	2000	#4	MOB
IS631	2001	#5	DSO Bokalce
IS1442	2001	#5	DSO Bokalce
IS1932-1	2001	#6	np
IS1932-2	2001	#6	np
IS2508	2001	#7	ZD Medi
IS4138	2001	#8	ZD Cerknica
IS4197	2001	#9	UA
IS653	2002	#10	MOB
IS1790	2002	#9	UA
IS3057	2002	#11	BT
IS3713	2002	#11	BT
IS1770	2003	#12	MOB
IS3209	2003	#13	DSO Poljane
IS3729	2003	#14	MOB
IS1002	2004	#15	UA
IS1664	2004	#15	ZD Šiška
IS 2434	2004	#16	ZD Polje
IS2920	2004	#17	BT
IS3004	2004	#18	UA
IS4400	2004	#19	DSO Šiška
IS447	2005	#20	BT
IS1043	2005	#21	DSO Bokalce
IS1047	2005	#22	ZD
IS2200	2005	#23	DSO Bokalce
IS4581	2005	#23	DSO Bokalce
IS1861	2005	np	np
IS4939	2005	np	np
IS5784	2005	np	np
IS539	2006	#24	UA
IS578	2006	np	np
IS1076	2006	#25	DSO Kolezija
IS1143	2006	#26	BT
IS1299	2006	#27	MOB

del. oz.	leto izolacije	pacient (šifrirano)	odvzem vzorca
IS1620	2006	#28	MOB
IS1676	2006	#28	MOB
IS1681	2006	#28	MOB
IS1722	2006	#28	MOB
IS2066	2006	#25	DSO Kolezija
IS2177	2006	#29	DSO Bokalce
IS3045	2006	#30	ZD Trbovlje
IS3339	2006	#31	Ordin. dr. Finžgar
IS3976	2006	#32	BT
IS4219	2006	#33	MOB
IS4128	2006	#34	BT
IS4287	2006	#33	MOB
IS4570	2006	np	np
IS4640	2006	#35	ZD Trbovlje
IS4861	2006	#36	MOB
IS49-1	2006	np	np
IS85-1	2006	#25	DSO Kolezija
IS134	2007	np	np
IS2006	2006	np	np
IS5076	2006	np	np

del. oz.- delovna oznaka, ki smo jo uporabljali pri delu; pacient (šifrirano)- ista šifra pomeni istega pacienta; odvzem vzorca- ime ustanove, kjer so odvzeli vzorec; UA- urološka ambulanta; MOB- mestna otroška bolnišnica; BT- bolnišnica Trbovlje; DSO- dom starejših občanov, np- ni podatka

Pri zbirki sevov iz IVZ Ljubljana smo ugotovili, da so nekateri sevi izolirani iz istih pacientov v časovnih zamikih. Pri sevih izoliranih iz istih pacientov, pri katerih smo z metodo PCR ugotovili, da pripadajo enaki filogenetski skupini in imajo prisotne enake β -laktamaze ter imajo enake antibiogrami, smo v izračunih upoštevali le enega. Upoštevali smo sev, ki je bil izoliran prvič. Sevi, ki so se ponovili so: 1790 (verjetno enak sevu 4197), 1664 (verjetno enak sevu 1002), 4581 (verjetno enak sevu 2200), 4287 (verjetno enak sevu 4219), 1076 (verjetno enak sevu 85) in sevi 1676, 1681 in 1722 (verjetno enaki sevu 1620).

Iz že omenjenih zdravstvenih ustanov so nam posredovali tudi podatke o rezistencah proti mnogim antibiotikom, ki so jih pridobili z difuzijsko metodo z diski. Podatki so prikazani v prilogah 1, 2 in 3. Pri sevih *E. coli* zbranih v Bolnišnici Golnik so vsi izolati, za katere so nam posredovali podatke, rezistentni proti ciprofloksacinu, pri sevih iz ZZV Murska Sobota je proti ciprofloksacinu rezistentnih 85 odstotkov in pri izolatih iz IVZ Ljubljana 89 odstotkov.

4.2 ANALIZA SEVOV

Vse seve *E. coli* smo z metodo PCR uvrstili v filogenetske skupine. Pri vseh sevih smo z metodo PCR preverili prisotnost zapisov za plazmidno kodirano rezistenco proti kinolonom (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr* in *qepA*) in določili skupine β -laktamaz. Pri vseh sevih smo poskusili s konjugacijo prenesti plazmide v recipientski sev *E. coli* J53AZ^r. Rezultati so prikazani v preglednici 11 ter obrazloženi v naslednjih poglavjih.

Preglednica 11: Rezultati analize sevov ESBL. Del. oz. pomeni delovno oznako seva, filog. sk. prikazuje uvrstitev seva v filogenetsko skupino (le seve *E. coli*), TK pomeni ali nam je pri danem sevu uspelo pridobiti transkonjuganto, pri čemer številke pomenijo, da smo transkonjugante izolirali na naslednjih gojiščih: 1- na gojišču z Az in Ap, 2- na gojišču z Az in Tc, 3- na gojišču z Az in Tp. Znaka + in - pomenita prisotnost (+) ali odsotnost (-) genov. Pri genu *qnr* smo preverjali prisotnost treh različic gena (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), zato v primeru prisotnosti gena piše za kateri gen gre, pri genu *qepA* smo preverjali le prisotnost enega gena. Pri genu za aminoglikozid acetiltransferazo smo z restrikcijo preverili ali je prisoten divji tip (*aac(6')-Ib*) ali mutirana različica alela (*aac(6')-Ib-cr*). Določili smo tudi prisotnost genov za skupine β -laktamaz: CTX-M (prisotnost smo preverjali z 2 različnima paroma začetnih oligonukleotidov: CTX-M in panCTX) OXA, TEM, SHV in DHA. Pri sevih ki so imeli prisoten zapis za β -laktamaze skupine CTX-M (pomnožen s katerimkoli od obeh parov začetnih oligonukleotidov), smo z dodatno PCR reakcijo določili za katero podskupino CTX-M gre. Podskupine so označene s številkami.

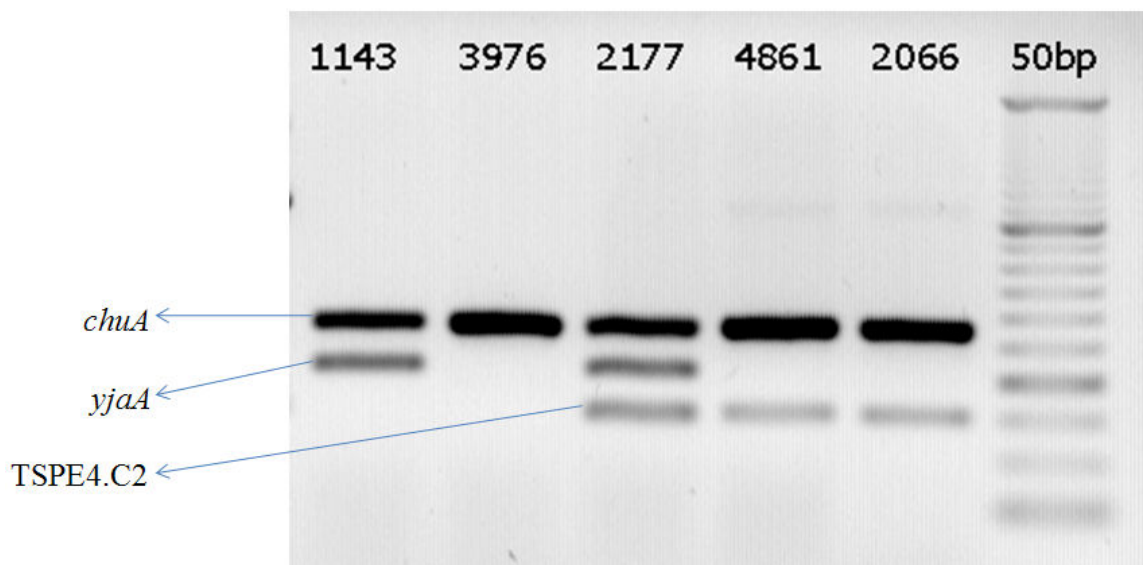
del. oz.	filog. sk.	TK	<i>qnr</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	panCTX	CTX-M	CTX sk.	OXA	TEM	SHV	DHA
1g	D ₂	1	-	-	+	+	+	+	1., 2.	+	+	-	-
2g	D ₂		-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
3g	D ₂		-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
4g	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
5g	D ₁	2	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
6g	B ₁	2	-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
7g	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
8g	B ₁		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
9g	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
10g	B _{2,3}		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
7Ah			-	-	+	-	-	-		-	-	-	-
8Sm			-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
9Sm			-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
10Sm			-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
11Pm		1	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
17Ab			-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
MS 1	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-		-	+	+	-
MS 2	D ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	+	-
MS 3	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-		-	+	+	-
MS 4	A ₁		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
MS 5	D ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
MS 6	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
MS 7	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
MS 8	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
MS 9	D ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	-	-

del. oz.	filog. sk.	TK	<i>qnr</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-lb</i>	<i>aac(6')-lb-cr</i>	panCTX	CTX-M	CTX sk.	OXA	TEM	SHV	DHA
MS10	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MS 11	D ₁	1,2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MS 12	D ₁	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MS 13	A ₁	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MS 14	D ₂		-	-	+	-	+	+	2.	-	+	-	-
MS 15	D ₁	3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MS 16	B _{2,3}		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
MS 17	D ₂	3	-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
MS 18	B _{2,3}	3	<i>qnrS</i> +	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
MS 19	B _{2,3}	1	-	-	-	-	+	-	1.	-	-	-	-
MS 20	D ₂	2	-	-	+	-	+	+	2.	-	+	-	-
MS 21	B _{2,3}	2	-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
MS 22	D ₂		-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
IS3341	D ₂		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IS4452	B ₁		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
IS5017	D ₂	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IS5345	B ₁		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IS631	D ₂	3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
IS1442	B ₁	1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
IS1932-1	D ₁	3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS1932-2	D ₁	1	-	-	-	+	+	-	1.	-	+	-	-
IS2508	D ₁	1,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS4138	D ₁		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
IS4197	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS653	B _{2,2}		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
IS1790	D ₁	1	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS3057	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS3713	B _{2,2}	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	-	+	-	-
IS1770	D ₂	1	-	-	-	-	+	-	1.	-	-	-	-
IS3209	A ₁	3	-	-	-	-	+	-	1.	+	-	-	-
IS3729	B _{2,2}		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IS1002	B ₁		-	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
IS1664	B ₁		-	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
IS2434	D ₁		-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS2920	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IS3004	B _{2,3}		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-

del. oz.	filog. sk.	TK	<i>qnr</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	panCTX	CTX-M	CTX sk.	OXA	TEM	SHV	DHA
IS4400	A ₁	2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	+	-
IS447	D ₁	2	-	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
IS1043	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
IS1047	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS2200	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	+	-
IS4581	A ₁		-	-	-	-	-	-		-	+	-	-
IS1861	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS4939	A ₁		-	-	-	+	+	-	1.	+	+	+	-
IS5784	A ₁	1,2		-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS539	D ₂	1	-	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
IS578	A ₁	1,2	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS1076	B ₂ ₃		-	-	+	-	-	-		-	+	+	-
IS1143	B ₂ ₂	2	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS1299	D ₁	1,2	-	-	-	-	+	-	1.	-	+	-	-
IS1620	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS1676	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS1681	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS1722	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS2066	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS2177	B ₂ ₃		-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS3045	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS3339	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS3976	D ₁	1,2	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS4219	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS4128	D ₁		-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS4287	D ₂		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS4570	A ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS4640	D ₁	1,2,3	-	-	-	+	+	-	1.	+	+	-	-
IS4861	D ₂	2	-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS49-1	B ₂ ₃		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-
IS85-1	B ₂ ₃	1,3	-	-	+	-	-	-		-	+	+	-
IS134	D ₂		-	-	-	-	+	+	2.	-	+	-	-
IS2006	B ₂ ₃	1,3	-	-	+	-	-	-		-	+	+	-
IS5076	B ₂ ₃		-	-	-	+	+	-	1.	+	-	-	-

4.2.1 Določanje filogenetskih skupin ESBL producirajočih sevov *E. coli*

Seve *E. coli* smo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti delov genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta TSPE4.C2 uvrstili v filogenetske skupine in podskupine. Na sliki 2 je prikazan primer preverjanja prisotnosti delov genov *chuA* (279 bp), *yjaA* (211 bp) in fragmenta TSPE4.C2 (152 bp).



Slika 2: Primer elektroforeze PCR pomnožkov treh filogenetskih markerjev. Sev IS1143 (oznaka 1143) pripada filogenetski skupini B₂, sev IS3976 (oznaka 3976) skupini D₁, sev IS2177(oznaka 2177) skupini B₃ in seva IS4861(oznaka 4861) in IS2066 (oznaka 2066) skupini D₂, oznaka 50 bp prikazuje lestvico.

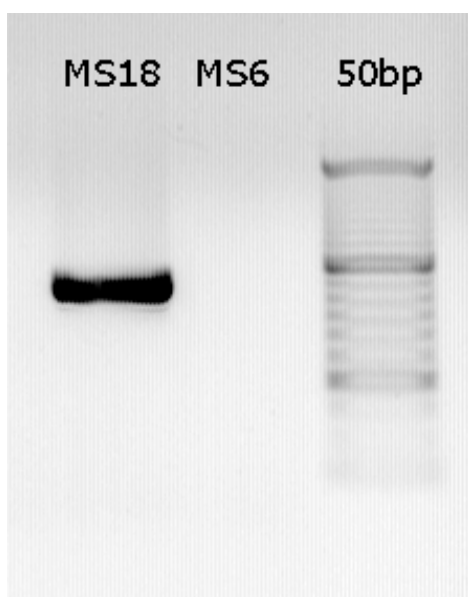
Preglednica 12: Uvrstitev sevov *E. coli* iz zbirke v filogenetske skupine. Oznaka filo. skupina pomeni filogenetsko skupino, Bol. Golnik pomeni Bolnišnico Golnik.

filo. skupina	število sevov (odstotek sevov)			skupaj
	Bol. Golnik	ZZV MS	IVZ LJ	
A ₁	3 (30)	2 (9,1)	8 (16,3)	13 (16,0)
B ₁	2 (20)	0	4 (8,2)	6 (7,4)
B ₂	0	0	4 (8,2)	4 (4,9)
B ₃	1 (10)	4 (18,2)	6 (12,2)	11 (13,6)
skupaj B ₂	1 (10)	4 (18,2)	10 (20,4)	15 (18,5)
D ₁	1 (10)	12 (54,6)	15 (30,6)	28 (34,6)
D ₂	3 (30)	4 (18,2)	12 (24,5)	19 (23,5)
skupaj D	4 (40)	16 (72,8)	27 (55,1)	47 (58,1)

Največ sevov iz vseh treh zbirk smo uvrstili v filogenetski skupini D₁ in D₂: v zbirki iz Golnika 40 %, v zbirki iz ZZV Murska Sobota 72,8 % in v zbirki iz IVZ Ljubljana 55,1 %, če pa seštejemo vse tri zbirke je zastopanost teh dveh skupin 58,1 %. V filogenetsko skupino A₁ smo v uvrstili 16 % sevov iz zbirk, v skupino B1 7,4 % in v skupini B2₂ in B2₃ 18,5 % sevov iz zbirk.

4.2.2 Ugotavljanje prisotnosti genov *qnr* s PCR in sekvenciranje nastalega pomnožka

Pri vseh sevih smo v multipleks PCR reakciji s 3 pari začetnih oligonukleotidov (QnrAm-F/QnrAm-R, QnrBm-F/ QnrBm-R, QnrSm-F/ QnrSm-R) pomnižili dele genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*. Zapisa *qnrA* in *qnrB* nismo našli pri nobenem sevu, zapis *qnrS*, katerega pomnožek je velik 428 bp, pa smo našli pri izolatu MS18. Ker je šlo za prvo najdbo tega gena v Sloveniji, smo PCR pomnožek očistili in poslali na sekvenciranje. Na podlagi dobljenega nukleotidnega zaporedja smo potrdili prisotnost gena *qnrS*. Na sliki 3 je prikazana slika pomnožka gena *qnrS*.



Slika 3: Primer elektroforeze PCR pomnožkov gena *qnrS*. Pomnožek je velik 428 bp, oznaka 50bp pomeni lestvico.

4.2.3 Ugotavljanje prisotnosti alela *aac(6')-Ib* in/ali *aac(6')-Ib-cr*, ki kodirata divjo in mutirano različico encima aminoglikozid acetiltransferaza

Pri vseh sevih smo s parom začetnih oligonukleotidov qac1/qac2 pomnožili del gena za encim aminoglikozid acetiltransferazo. Nastali 514 bp velik PCR pomnožek je lahko del nemutiranega alela *aac(6')-Ib*, kot tudi mutirane različice *aac(6')-Ib-cr*, ki posreduje rezistenco proti kinolonom. PCR pomnožek smo v ločenih restrikcijah razrezali z encimoma *TaaI* in *NdeI*, nato pa nastale fragmente ločili z elektroforezo na 1,5-odstotnem agaroznem gelu, ki smo ga po končani elektroforezi presvetlili z UV-svetlobo pri valovni dolžini 302 nm in nato slikali. Natančen postopek je opisan v razdelku o materialih in metodah.

Glede na velikost nastalih fragmentov po restrikciji PCR pomnožka z encimoma *TaaI* in *NdeI*, ki je prikazana v preglednici 13, smo določili prisotnost alela *aac(6')-Ib* in/ali alela *aac(6')-Ib-cr*. Po restrikciji z encimom *TaaI* smo tako pri nemutiranem alelu dobili fragmente velikosti 75, 108 in 331 bp, v primeru mutirane različice pa fragmente velikosti 75, 217, 108 in 114 (fragmenta 108 in 114 sta bila na agaroznem elektroforeznem gelu vidna kot en močnejši fragment). Če sta bila prisotna oba alela hkrati smo na agaroznem elektroforeznem gelu zasledili fragmente velike 75, 108+114, 217 in 331 bp. Po restrikciji z encimom *NdeI* smo v primeru nemutiranega alela zasledili na gelu le nerazrezan produkt, v primeru mutirane različice alela pa fragmenta velikosti 63 in 451 bp. Če sta bila prisotna oba alela smo zasledili tri fragmenti velikosti 63, 451 in 514 bp.

Preglednica 13: Velikost fragmentov po restrikciji qac1/qac2 PCR pomnožkov z encimoma *TaaI* in *NdeI* v primeru *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* različice gena za aminoglikozid acetiltransferazo

	restrikcija s <i>TaaI</i> (velikost fragmentov v bp)	restrikcija z <i>NdeI</i> (velikost fragmentov v bp)
alel <i>aac(6')-Ib</i>	331 108 75	514
alel <i>aac(6')-Ib-cr</i>	108 + 114 217 75	451 63

Prisotnost obeh različic gena pri izolatih *E. coli* iz vseh treh ustanov je prikazana v preglednici 14. Prisotnost obeh alelov smo preverjali tudi pri zbirki ne *E. coli* izolatov, kjer smo pri izolatu 7Ah (*Aeromonas hydrophyla*) našli divji tip alela za aminoglikozid acetiltransferazo.

Mutirana oblika gena za aminoglikozid acetiltransferazo se prvič pojavi leta 2001 v zbirki iz IVZ Ljubljana. Po letu 2001 se mutirana različica gena pojavlja vsako leto (razen leta 2003 iz katerega imamo le 3 izolate). V zbirki iz ZZV Murska Sobota se mutirana oblika gena za aminoglikozid acetiltransferazo prvič pojavi v izolatu iz leta 2005 (starejših izolatov nimamo), v zbirki iz Golnika pa leta 2006.

V zbirki iz IVZ Ljubljana je brez zapisa za aminoglikozid acetiltransferazo le 22,4 % sevov, v zbirkah iz ZZV Murska Sobota in Bolnišnice Golnik pa približno 80 % sevov. V zbirki iz IVZ Ljubljana se pogosteje pojavlja zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze, saj se pojavi pri 63,2 % sevih, medtem ko se divji tip alela pojavi pri le 11,1 % sevov. Tudi v zbirki iz Bolnišnice Golnik se pogosteje pojavi zapis za mutirano različico encima (20 %), kot za divji tip (10 %). V zbirki iz ZZV Murska Sobota je pojavnost obeh različic gena enaka (9,1 %).

Zanimiva je tudi ugotovitev, da ima 88,6 odstotkov sevov z mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze tudi zapis za β -laktamaze skupine OXA.

Preglednica 14: Prisotnost divjega tipa gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib* in mutirane različice *aac(6')-Ib-cr*. Rezultati so prikazani posamezno in skupno po zbirkah *E. coli* in letih. V tabeli so poleg števila sevov navedeni še odstotki v oklepajih.

		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2000-2007
Golnik	skupno število sevov	3	-	-	-	-	-	2	5	10
	le divji tip alela	0	-	-	-	-	-	0	0	0
	le mutiran alel	0	-	-	-	-	-	0	1 (20)	1 (10)
	oba alela hkrati	0	-	-	-	-	-	1 (50)	0	1 (10)
	alel ni prisoten	3 (100)	-	-	-	-	-	1 (50)	4 (80)	8 (80)
ZZV MS	skupno število sevov	-	-	-	-	-	12	2	8	22
	le divji tip alela	-	-	-	-	-	0	0	2 (25)	2 (9,1)
	le mutiran alel	-	-	-	-	-	1 (8,3)	0	1 (12,5)	2 (9,1)
	oba alela hkrati	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	alel ni prisoten	-	-	-	-	-	11 (91,7)	2 (100)	5 (62,5)	18 (81,8)
IVZ Lj	skupno število sevov	4	7	3	3	5	7	19	1	49
	le divji tip alela	2 (50)	2 (28,6)	0	0	0	0	3 (15,8)	0	7 (14,3)
	le mutiran alel	0	5 (71,4)	3 (100)	0	4 (80)	4 (57,1)	15 (78,9)	0	31 (63,2)
	oba alela hkrati	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	alel ni prisoten	2 (50)	0	0	3 (100)	1 (20)	3 (42,9)	1 (5,3)	1 (100)	11 (22,4)
skupaj	skupno število sevov	7	7	3	3	5	19	23	14	81
	le divji tip alela	2 (28,6)	2 (28,6)	0	0	0	0	3 (13,0)	2 (14,3)	9 (11,1)
	le mutiran alel	0	5 (71,4)	3 (100)	0	4 (80)	5 (26,3)	15 (65,2)	2 (14,3)	34 (42,0)
	oba alela hkrati	0	0	0	0	0	0	1 (4,3)	0	1 (1,2)
	alel ni prisoten	5 (71,4)	0	0	3 (100)	1 (20)	14 (73,7)	4 (17,4)	10 (71,4)	37 (45,7)

4.2.4 Ugotavljanje prisotnosti gena *qepA*

Prisotnost gena *qepA* smo preverjali z metodo PCR, kot je opisano v poglavju materiali in metode. Gena *qepA* nismo našli pri nobenem izmed sevov.

4.2.5 Določanje skupin β -laktamaz

Seve smo z metodo PCR ob uporabi ustreznih začetnih oligonukleotidov uvrstili v skupine ESBL in skupino DHA. Pomnoževali smo gene specifične za skupine OXA, TEM, SHV, CTX-M in DHA (β -laktamaza, ki pa je ne uvrščamo med ESBL).

Zapis za encime skupine CTX-M smo najprej pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov CTX.F/CTX.R, ki naj bi bil specifičen za vse podskupine CTX-M. Ker je bil delež pozitivnih izolatov nižji od pričakovanega, smo PCR reakcijo ponovili še s parom začetnih oligonukleotidov PANCTX-M.F/PANCTX-M.R. Kasneje, ko smo določali podskupine, se je izkazalo, da je bil prvi par začetnih oligonukleotidov specifičen le za

drugo podskupino. CTX-M pozitivne izolate smo nato s pari začetnih oligonukleotidov, ki so prikazani v preglednici 15, uvrstili v podskupine CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 in CTX-M-9.

Preglednica 15: Pari začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje genov, na podlagi katerih uvrščamo encime CTX-M v podskupine

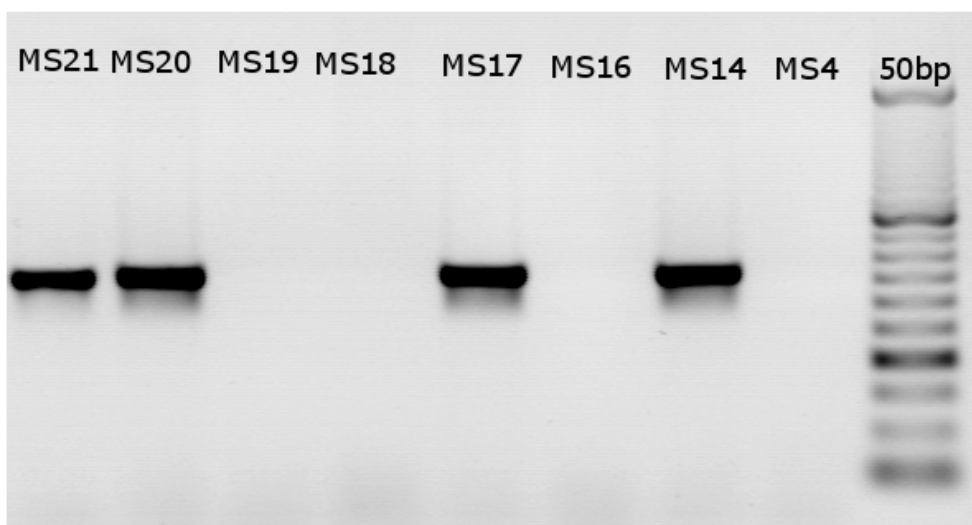
oznaka začetnega oligonukleotida	podskupina CTX-M
CTXM.I.F3	CTX-M-1
CTXM.I.R2	
CTXM.II.TOHO1.2.F	CTX-M-2
CTXM.II.TOHO1.1.R	
CTXM8.WSAIII.F	CTX-M-8
CTXM8.WSAIII.R	
CTXM914.IV.F	CTX-M-9
CTXM914.IV.R	

Rezultati za zbirke *E. coli* iz vseh treh ustanov so prikazani v tabeli 16. Prisotnost skupin β -laktamaz smo preverjali tudi pri ne *E. coli* izolatih. Pri izolatih 11Pm (*Proteus mirabilis*) in 17Ab (*Acinetobacter baumannii*) smo odkrili zapis za β -laktamazo skupine TEM. Pri vseh izolatih smo preverjali tudi prisotnost β -laktamaz skupine DHA, vendar jih nismo našli.

V zbirki *E. coli* iz Golnika in ZZV Murska Sobota smo zapis za β -laktamaze skupine CTX-M-1 našli pri približno 20 odstotkih sevov, pri zbirki iz IVZ Ljubljana pa pri skoraj 70 odstotkih. V Ljubljanski zbirki se je ta skupina prvič pojavila že leta 2001, v zbirki iz Murske Sobote leta 2005 (starejših izolatov iz te ustanove nismo dobili) in v zbirki iz Golnika leta 2006.

Zapis za β -laktamaze skupine CTX-M-2 smo našli pri 30 odstotkih sevov iz zbirke *E. coli* iz Golnika, pri 22,7 odstotkih sevov iz Murske Sobote in pri le dveh odstotkih sevov iz IVZ Ljubljana. Skupina CTX-M-2 se je leta 2006 pojavila v zbirkah iz Murske Sobote in Golnika, leta 2007 pa tudi v zbirki iz IVZ Ljubljana. Delež izolatov z zapisom za β -laktamaze skupin CTX-M narašča vse od pojava leta 2001 in že od leta 2006 prevladuje med skupinami ESBL.

Pri izolatih iz vseh treh zbirk smo našli tudi zapise za β -laktamaze skupin TEM in OXA. Skupina TEM se največkrat pojavi v zbirki iz Murske Sobote (pri več kot 80 % sevov), skupina OXA pa pri izolatih iz zbirke IVZ Ljubljana (pri skoraj 60 odstotkih sevov). Zanimivo je, da se skupina OXA zelo pogosto pojavlja skupaj z genom za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze. Skupino SHV pa smo našli pri 22,2 % izolatov iz IVZ Ljubljana in 31,8 % izolatov iz ZZV Murska Sobota.



Slika 4: Primer elektroforeze PCR pomnožkov zapisa za β -laktamaze skupine CTX-M-1. Pomnožek je velik 351 bp.

Preglednica 16: Določanje skupin β -laktamaz. Rezultati so prikazani posamezno in skupno po zbirkah *E. coli* in letih. V tabeli so poleg števila sevov navedeni še odstotki v oklepajih.

		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2000-2007
Golnik	skupno število sevov	3	-	-	-	-	-	2	5	10
	CTX-M-1	0	-	-	-	-	-	1 (50)	1 (20)	2 (20)
	CTX-M-2	0	-	-	-	-	-	2 (100)	1 (20)	3 (30)
	OXA	0	-	-	-	-	-	1 (50)	1 (20)	2 (20)
	TEM	1 (33,3)	-	-	-	-	-	2 (100)	2 (40)	5 (50)
	SHV	0	-	-	-	-	-	0	0	0
	nobena izmed teh sk.	2 (66,7)	-	-	-	-	-	0	2 (40)	4 (40)
ZZV MS	skupno število sevov	-	-	-	-	-	12	2	8	22
	CTX-M-1	-	-	-	-	-	1 (8,3)	0	3 (37,5)	4 (18,2)
	CTX-M-2	-	-	-	-	-	0	1 (50)	4 (50)	5 (22,7)
	OXA	-	-	-	-	-	1 (8,3)	0	1 (12,5)	2 (9,1)
	TEM	-	-	-	-	-	10 (83,3)	2 (100)	6 (75,0)	18 (81,8)
	SHV	-	-	-	-	-	5 (41,7)	1 (50)	1 (12,5)	7 (31,8)
	nobena izmed teh sk.	-	-	-	-	-	0	0	0	0
IVZ Lj	skupno število sevov	4	7	3	3	5	7	19	1	49
	CTX-M-1	0	4 (57,1)	2 (66,7)	2 (66,7)	4 (80)	5 (71,4)	17 (89,5)	0	34 (69,4)
	CTX-M-2	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	1 (2,0)
	OXA	0	3 (42,9)	1 (33,3)	2 (66,7)	4 (80)	4 (57,1)	15 (78,9)	0	29 (59,2)
	TEM	1 (25)	7 (100)	2 (66,7)	1 (33,3)	4 (80)	6 (85,7)	12 (63,2)	1 (100)	34 (69,4)
	SHV	2 (50)	2 (28,6)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (20)	2 (28,6)	2 (10,5)	0	11 (22,4)
	nobena izmed teh sk.	2 (50)	0	0	0	0	0	0	0	2 (4,1)
skupaj	skupno število sevov	7	7	3	3	5	19	23	14	81
	CTX-M-1	0	4 (57,1)	2 (66,7)	2 (66,7)	4 (80)	6 (31,6)	18 (78,3)	4 (28,6)	40 (49,4)
	CTX-M-2	0	0	0	0	0	0	3 (13,0)	6 (42,9)	9 (11,1)
	OXA	0	3 (42,9)	1 (33,3)	2 (66,7)	4 (80)	5 (26,3)	16 (69,6)	2 (14,3)	33 (40,7)
	TEM	2 (28,6)	7 (100)	2 (66,7)	1 (33,3)	4 (80)	16 (84,2)	16 (69,6)	9 (64,3)	57 (70,4)
	SHV	2 (28,6)	2 (28,6)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (20)	7 (36,8)	3 (13,0)	1 (7,1)	18 (22,2)
	nobena izmed teh sk.	4 (57,1)	0	0	0	0	0	0	2 (14,3)	6 (7,4)

4.2.6 Ugotavljanje prisotnosti zapisov za nekatere virulentne dejavnike

Pri sevih, ki izločajo ESBL, zbranih v Bolnišnici Golnik in v ZZV MS smo z metodo PCR z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi preverili prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov. Produkta PCR smo vnesli v agarozni gel ter ga po končani elektroforezi presvetlili z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm.

V preglednici 18 so prikazani rezultati PCR za seve *E. coli*. Vsi izolati so imeli zapis *fimH*, 78,1 % izolatov je imelo zapis *kpsMT II*, 50 % je imelo zapis *iha*. Zapise *hra*, *iss* in *hlyA* je imelo 6,3 % izolatov, zapis *ibeA* pa 3,1 % izolatov. Zapisov *EHEChly*, *cnf* in *neuC* nismo našli pri nobenem izolatu.

V preglednici 17 je prikazano povprečno število virulentnih dejavnikov pri sevih iz posameznih filogenetskih skupin.

Preglednica 17: Povprečno število izbranih virulentnih dejavnikov (VD) pri ESBL izolatih *E. coli* iz posameznih filogenetskih skupin (filog. sk.). V raziskavo so bili vključeni izolati iz zbirke ZZV Murska Sobota in Bolnišnice Golnik.

filog. sk.	število sevov	povprečno število VD
A ₁	5	1,4
B ₁	2	1,5
B ₂ ₃	5	3,4
D ₁	7	2,9
D ₂	13	2,3
skupaj	32	2,5

Prisotnost vseh zgoraj naštetih virulentnih dejavnikov smo preverili tudi pri ne *E. coli* ESBL izolatih (7Ah, 8 Sm, 9Sm, 10SM, 11Pm, 17Ab), vendar jih pri teh sevih nismo zasledili.

Preglednica 18 : Virulentni dejavniki sevov *E. coli*, ki izločajo ESBL: delovna oznaka, filogenetska skupina, prisotnost zapisa za nekatere virulentne dejavnike.

del. oznaka	filog. sk.	ADHEZINI				IZOGIB IM. SIS.			TOKSINI IN INVAZINI				
		<i>fimH</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>kpsMT II</i>	<i>iss</i>	<i>hlyA</i>	<i>EHEChty</i>	<i>cnf</i>	<i>ibeA</i>	<i>neuC</i>		
MS 1	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 2	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 3	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 4	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS 5	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 6	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 7	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 8	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 9	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 10	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 11	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 12	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 13	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS 14	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 15	D ₁	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 16	B ₂₃	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 17	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 18	B ₂₃	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 19	B ₂₃	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	
MS 20	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 21	B ₂₃	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
MS 22	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

oznaka seva	del. oznaka	filog. sk.	ADHEZINI				IZOGIB IM. SIS.				TOKSINI IN INVAZINI				
			<i>fimH</i>	<i>iha</i>	<i>hra</i>	<i>kpsMT II</i>	<i>iss</i>	<i>hlyA</i>	<i>EHEChly</i>	<i>cnf</i>	<i>ibeA</i>	<i>neuC</i>			
1	1g	D ₂	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2g	D ₂	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3g	D ₂	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4g	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	5g	D ₁	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6g	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	7g	A ₁	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	8g	B1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	9g	A ₁	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	10g	B ₂₃	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
št. sevov			32	16	2	25	2	2	2	0	0	0	0	1	0
% sevov			100	50	6,3	78,1	6,3	6,3	6,3	0	0	0	0	3,1	0

IZOGIB IM. SIS. - virulentni dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu, *fimH*- fimbrije tipa 1, *iha*, *hra*- nefimbrialna adhezina, *kpsMT II*- kapsula tipa 2, *iss*- faktor za serumsko odpornost, *hlyA*- hemolizin, *EHEChly*- enterohemolizin, *cnf*- citotoksični nekrotični faktor, *ibeA*- invazin, *neuC*- invazin, +- virulentni dejavnik je prisoten, -ni prisoten, števílo sevov/odstotek sevov, ki ima določen virulentni dejavnik.

4.2.7 Določanje restriksijskega profila izbranih ESBL producirajočih sevov *E. coli*

Z metodo PFGE smo sedemnajstim izolatom iz zbirke IVZ Ljubljana uspešno določili restriksijski profil. Pri nekaterih izolatih metoda zaradi fragmentacije genomske DNA ni bila uspešna. Restriksijske profile genomske DNA smo razvrstili v enajst razredov. V posamezen razred smo uvrstili seve, katerih restriksijski profil je bil enak ali pa se je razlikoval v največ enem fragmentu. V preglednici 19 je prikazana razvrstitev sevov v razrede glede na restriksijski profil genomske DNA .

Namen določanja restriksijskega profila ESBL producirajočih sevov *E. coli* iz zbirke IVZ Ljubljana je bil preveriti ali gre med izolati za klonalno razširjene seve.

Preglednica 19: Razdelitev sevov glede na restriksijski profil genomske DNA: razvrstitev v isti razred pomeni enak restriksijski profil.

sev	PFGE razred
IS1620 IS2066 IS4861	I
IS1932-1 IS1047	II
IS3339 IS4219	III
IS134	IV
IS4570 IS4400	V
IS85	VI
IS3004	VII
IS1299	VIII
IS2177	IX
IS49	X
IS578	XI

4.3 ANALIZA TRANSKONJUGANT

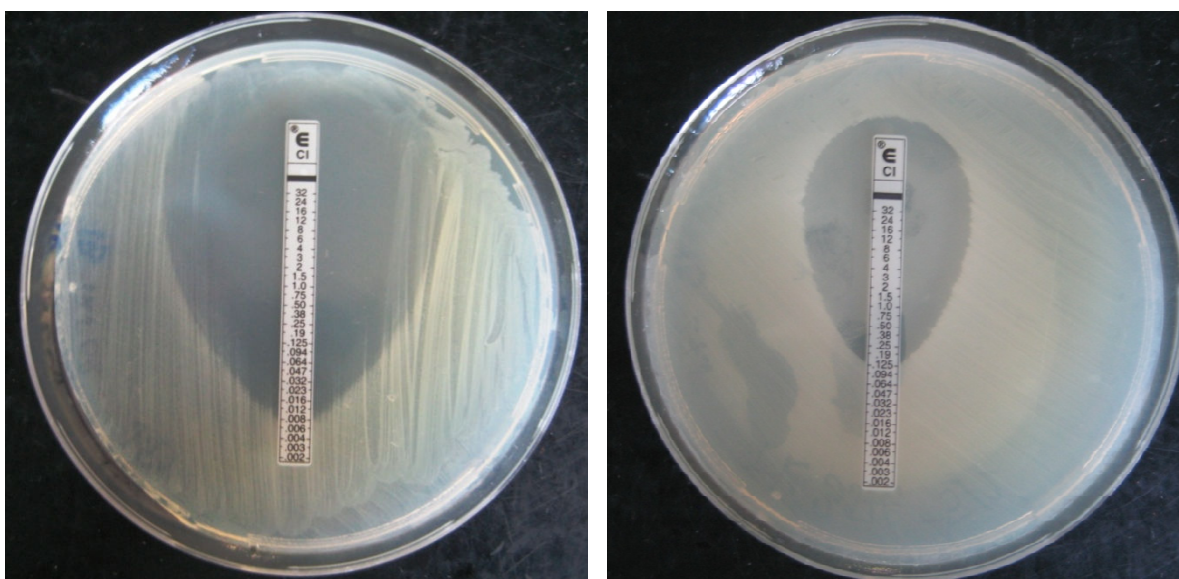
Prenos konjugativnih plazmidov smo izvedli s konjugacijo, ki je opisana v razdelku o materialih in metodah. Kot donorje smo uporabili seve iz naše zbirke, recipientski sev pa je bil v vseh primerih sev *E. coli* J53 Az^r. Transkonjugante smo izolirali iz treh selekcijskih gojišč s kombinacijo dveh protimikrobnih učinkovin: natrijevega azida in ampicilina, tetraciklina ali trimetoprima. Natrijev azid smo uporabili kot kontraselekcijo proti donorju, ostale antibiotike pa za selekcijo primarnih transkonjugant s prenešenimi plazmidi. Za dodatno potrditev, da smo res izolirali transkonjugante, smo z metodo PCR preverili ali pripadajo vse transkonjugante filogenetski skupini recipienta, to je skupini A₁. Zapis za filogenetsko skupino je namreč zapisan na kromosomu in se s konjugacijo ne prenese.

Plazmide nam je uspelo prenesti iz 46 donorskih sevov. V preglednici 11 je prikazano pri katerih sevih in iz katerih gojišč nam je uspelo izolirati transkonjugante. Transkonjugante smo označili z istimi številkami kot donorske seve, namesto oznake IS pa smo dodali oznako TK ter za poševnico pripisali številke 1, 2 ali 3, pri čemer številke pomenijo, da smo transkonjugante izolirali na naslednjih gojiščih: 1- na gojišču z Az in Ap, 2- na gojišču z Az in Tc, 3- na gojišču z Az in Tp. Pri vseh transkonjugantah smo s pomočjo Etestov za ciprofloksacin preverili, če nam je poleg rezistence za β -laktamske antibiotike uspelo prenesti tudi rezistenco proti ciprofloksacinu. Pri transkonjugantah, kjer je bil donorski sev iz zbirke IVZ Ljubljana smo izolirali plazmidno DNA in jo razrezali z encimom *Pst*I. Nastale fragmente smo ločili z elektroforezo in glede na vzorec fragmentov plazmide uvrstili v skupine.

4.3.1 Minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri transkonjugantah

Transkonjugantam in recipientskemu sevu *E. coli* J53 Az^r smo z difuzijsko metodo Etest, ki je opisana v razdelku o materialih in metodah, določili minimalne inhibitorne koncentracije za antibiotik ciprofloksacin. Na sliki 5 sta prikazana primera plošč z gojiščem LB z Etestom za recipientski sev *E. coli* J53 Az^r in eno izmed transkonjugant. V preglednici 20 so prikazane vrednosti MIC transkonjugant ter dvig MIC glede na recipientski sev, prikazana je tudi prisotnost divjega tipa in mutirane različice alela za aminoglikozid acetiltransferazo pri donorskem sevu.

Pri primarnih transkonjugantah 10 sevov se je MIC glede na recipientski sev (0,008 µg/ml) povišala za 8-krat (0,064 µg/ml). Pri enem sevu se je povišala 12-krat (0,094 µg/ml) pri enem za 16-krat (0,125 µg/ml). Pri petih sevih se je zvišala 6-krat (0,047 µg/ml) in pri enem sevu 4-krat (0,032 µg/ml). Pri donorskih sevih vseh teh transkonjugant je bil prisoten alel za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze. Pri petnajstih transkonjugantah se je MIC dvignila od 1,5-krat (0,012 µg/ml) do 3-krat (0,032 µg/ml). Pri trinajstih transkonjugantah se MIC za ciprofloksacin pri transkonjugantah ni povišala.



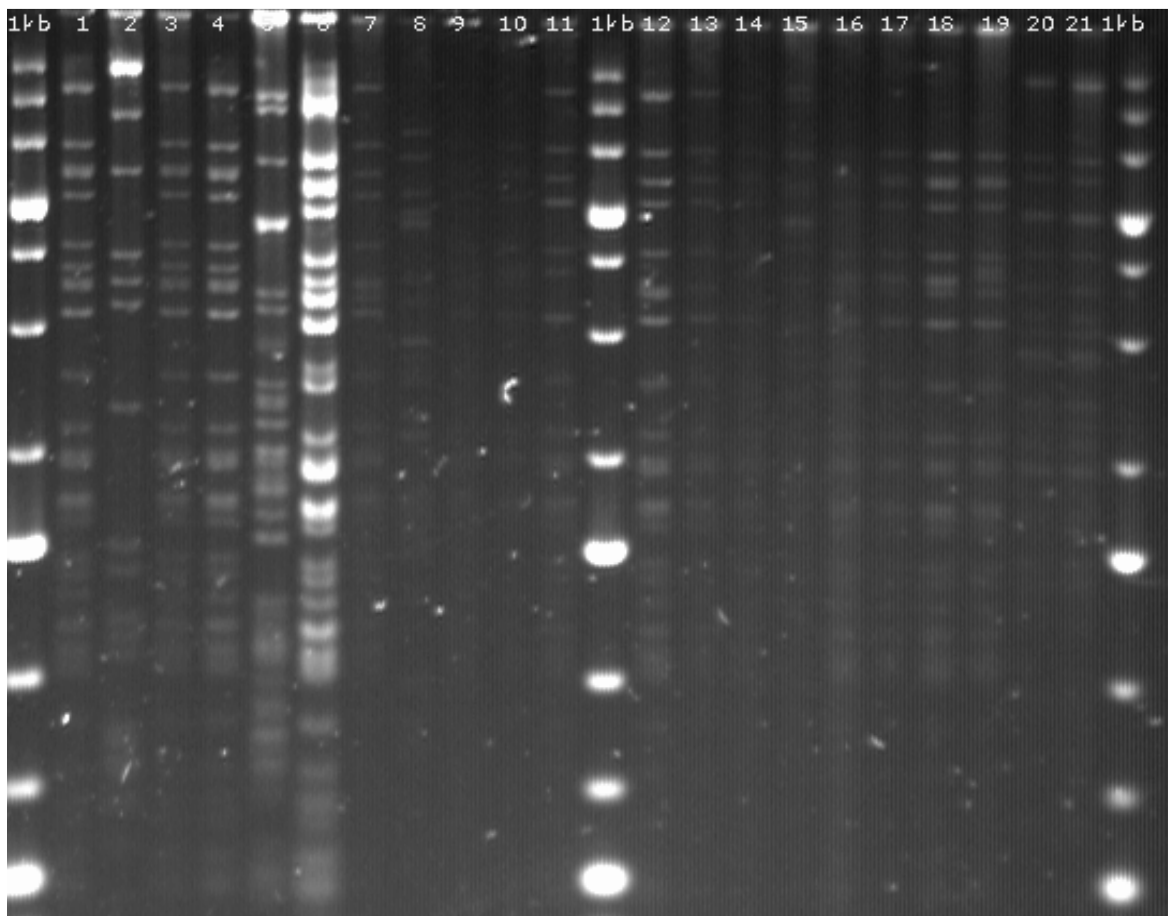
Slika 5: Primera difuzijske metode Etest, s katero smo ugotavljali MIC za ciprofloksacin. Levo je prikazana plošča z nacepljenim recipientskim sevom *E. coli* J53 Az^r, desno pa plošča z nacepljeno transkonjuganto 3976/2.

Preglednica 20: MIC za ciprofloksacin pri transkonjugantah. Poleg MIC in dviga MIC glede na J53 Az^r je prikazana še prisotnost divjega tipa (*aac(6')-Ib*) in mutiranega alela (*aac(6')-Ib-cr*) za aminoglikozid acetiltransferazo pri donorskem sevu.

MIC v µg/ml (dvig glede na <i>E. coli</i> J53 Az ^r)	transkonjuganta	značilnost donorskega seva	
		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
0,008 (0)	6g/2	-	+
	MS11/1	-	-
	MS19/1	-	-
	MS15/3	-	-
	MS17/3	-	-
	MS12/1	-	-
	MS13/1	-	-
	MS18/3	-	-
	MS20/2	+	-
	5017/1	-	-
	631/3	+	-
	1442/1	+	-
0,012 (1,5)	1299/1	-	-
	MS6/2	-	-
	MS10/1	-	-
	MS1/1	-	-
	MS7/4	-	-
	MS3/1	-	-
	3057/1	-	+
	447/2	-	-
0,016 (2)	539/1	-	-
	4128/3	-	+
	3209/1	-	-
	2006/1	+	-
	85/1	+	-
0,023 (3)	1770/1	-	-
	11Pm/1	-	-
0,032 (4)	MS8/1	-	-
0,047 (6)	4861/2	-	+
	1g/1	+	+
	4197/1	-	+
	3045/1	-	+
	1790/1	-	+
	3713/1	-	+
0,064 (8)	4570/1	-	+
	1047/1	-	+
	1143/2	-	+
	3976/1	-	+
	4640/1	-	+
	5781/1	-	+
	2508/1	-	+
	4400/2	-	+
0,094 (12)	1932-1/1	-	+
	578/1	-	+
0,125 (16)	2920/2	-	+
	3976/2	-	+

4.3.2 Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant

Iz 21 transkonjugant smo z alkalno hidrolizo po prirejenem postopku izolirali plazmidno DNA, ki smo jo nato razrezali z encimom *Pst*I. Postopek izolacije in restrikcije je opisan v razdelku o materialih in metodah. Restriksijske mešanice smo vnesli v jamice 1-odstotnega agaroznega gela ter fragmente ločevali približno 18 ur pri napetosti 3 V/cm gela.



Slika 6: Restriksijski profil plazmidov 21 transkonjugant po restrikciji s *Pst*I. Transkonjugante so označene: 1- TK 3976/2, 2- TK 85/1, 3- TK 4640/2, 4- TK 3045/2, 5- TK 1299/2, 6- TK 1143/2, 7- TK 578/2, 8- TK 539/1, 9- TK 5781/2, 10- TK 1047/2, 11- TK 447/2, 12- TK 4400/2, 13- TK 2920/2, 14- TK 3713/1, 15- TK 3057/2, 16- TK 1790/1, 17- TK 4197/2, 18- TK 2508/1, 19- TK 1932-1/1, 20- TK 1442/1, 21- TK 631/3. Z oznako 1 kb je označena 1 kilobazna lestvica (1 kb Plus DNA Ladders), na sliki so od zgoraj navzdol vidni fragmenti velikosti: 20 kb, 10 kb, 7 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 700 bp, 500 bp.

Z analizo fragmentov restrikcijskega profila plazmidov 21 transkonjugant smo ugotovili, da imamo 12 različnih restrikcijskih vzorcev. Razdelili smo jih v tri skupine. Plazmidi v skupini 1 imajo enak restrikcijski profil. Plazmide skupine 2, katerih osnovni restrikcijski profil je podoben, smo razdelili v 4 podskupine: plazmidi podskupin 2a, 2b in 2c imajo enake restrikcijske profile, plazmidi skupine 2d pa podobne. Plazmidi, ki smo jih uvrstili v 3 skupino imajo različne restrikcijske profile ali pa jih zaradi premalo vidnih fragmentov nismo mogli uvrstiti v skupine.

V plazmidnem razredu 1 je enak plazmid prisoten pri dveh izolatih pripadajočih različnima filogenetskima skupinama, vendar izoliranih iz istega pacienta. To najverjetneje pomeni, da se je plazmid prenesel iz enega seva v drugi sev.

Preglednica 21: Razvrstitev plazmidov, izoliranih iz transkonjugant v razrede. V plazmidne razrede od 1 do 2c smo uvrstili plazmide z enakim restrikcijskim profilom, v skupino 2d s podobnim, plazmidi iz skupine 3 pa so med seboj različni. Vsi plazmidi iz razreda 2 imajo enak osnovni restrikcijski profil, razlikujejo se le v nekaj fragmentih. Poleg so navedene še značilnosti donorja: filogenetska skupina, uvrstitev glede na restrikcijski profil genomske DNA, leto izolacije in pacient iz katerega je bil izoliran.

plazmidni razred	transkonjuganta	značilnosti donorja			
		filo. sk.	PFGE razred	leto izolacije	pacient
1	631/3	D ₂		2001	#5
	1442/1	B1		2001	#5
2a	2508/1	D ₁		2001	#7
	4197/2	D ₁		2001	#9
	1790/1	D ₁		2002	#9
2b	2920/2	D ₁		2004	#17
	4400/2	A ₁	V	2004	#19
	578/2	A ₁	XI	2006	np
2c	5781/2	A ₁		2005	np
	3045/2	D ₁		2006	#30
	4640/2	D ₁		2006	#35
	3976/2	D ₁		2006	#32
2d	1932-1/1	D ₁	II	2001	np
	447/2	D ₁		2005	#20
	1143/2	B2 ₂		2006	#26
3	85/1	B2 ₃	VI	2006	#25
	1299/2	D ₁	VIII	2006	#27
	539/1	D ₂		2006	#24
	3057/2	D ₁		2002	#11
	3713/1	B2 ₂		2002	#11
	1047/2	D ₁	II	2005	#22

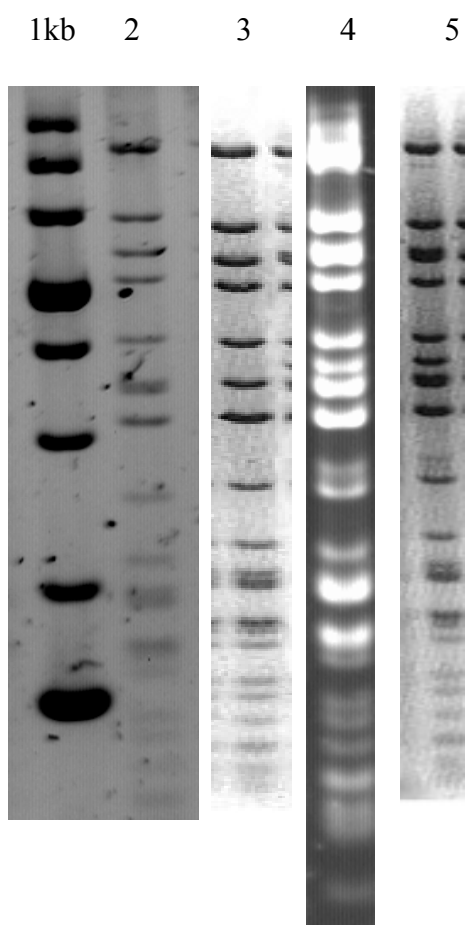
4.3.3 Primerjava plazmidov uropatogenih ESBL izolatov *E. coli* in *Klebsiella*

Da bi še dodatno preverili hipotezo o kroženju plazmidov, ne le med klonalno nepovezanimi sevi iste vrste (*E. coli*), temveč tudi med rodovi, smo restrikcijske profile plazmidov *E. coli* primerjali z restrikcijskimi profili bakterij iz rodu *Klebsiella*. Restrikcijske profile plazmidov izoliranih iz transkonjugant bakterij iz rodu *Klebsiella* je v diplomski nalogi naredil Rok Keber (2007), prav tako so po njegovem delu povzeti nekateri podatki v preglednici 22.

Na sliki 7 so prikazani restrikcijski profili štirih plazmidov, katerih osnovna zgradba je podobna in se razlikujejo v zgolj nekaj fragmentih. Profila plazmidov 2 in 3 se razlikujeta v zgolj enem fragmentu, restrikcijska profila plazmidov 4 in 5 pa sta enaka. V preglednici 22 so prikazani podatki o sevih iz katerih izhajajo plazmidi. Vsi štirje sevi so bili identificirani na IVZ Ljubljana in izločajo β -laktamaze razširjenega spektra delovanja (ESBL).

Preglednica 22: Značilnosti donorskih sevov transkonjugant, katerih plazmidi so si sorodni. Poleg oznake na sliki 7 (ozn.na sl.7) in oznake transkonjugant so prikazani nekateri podatki o donorskem sevu. Navedeni so vrsta ali rod, oznaka, leto izolacije, ustanova, kjer so donorski sev izolirali ter prisotnost divjega tipa (*aac(6')-Ib*) in mutirane različice (*aac(6')-Ib-cr*) gena za aminoglikozid acetiltransferazo pri donorskem sevu.

ozn.na sl.7 transkonjuganta		podatki o donorskem sevu					
		vrsta/ rod	donorski sev	leto izolacije	vir	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
2	TK 4400/2	<i>E. coli</i>	IS4400	2004	DSO Šiška	-	+
3	TK 8	<i>Klebsiella</i>	4319-1	2003	DSO Kolezija	-	+
4	TK 1143/2	<i>E. coli</i>	IS1143	2006	BT	-	+
5	TK 2	<i>Klebsiella</i>	2237-1	3003	DSO Kolezija	-	+



Slika 7: Primerjava restrikcijskih profilov plazmidov izoliranih iz *E. coli* in *Klebsiella*. Z oznako 1 kb je označen 1 kilobazna lestvica (1 kb Plus DNA Ladders), s številkami od 2 do 5 pa transkonjugante: TK 4400/2 (*E. coli*), TK 8 (*Klebsiella*), TK 1143/2 (*E. coli*) in TK 2 (*Klebsiella*).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V razvitih državah so okužbe sečil najpogostejši vzrok bolnišničnih in izvenbolnišničnih okužb (Stamm in Norrby, 2001). Vzrok za 90-odstotkov akutnih okužb je *E. coli*. Poleg uropatogenih sevov poznamo še približno 200 sevov *E. coli*, ki povzročajo gastrointestinalne motnje, nekateri sevi pa povzročajo meningitis (Stamm in Hooton, 1993; Madigan in sod., 2003).

Zdravljenje infekcij sečil s protimikrobnimi učinkovinami ni vedno uspešno. Težave se pojavijo predvsem v primeru invazivnih postopkov, pri katerih pogosto pride do okužb z bakterijami iz bolnišničnega okolja. To so največkrat po Gramu negativne enterobakterije, ki so rezistentne proti širokemu spektru protimikrobnih učinkovin (Spoering in Lewis, 2001).

Sevi, ki izločajo β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) so klinično rezistentni proti večini β -laktamskih antibiotikov. ESBL pozitivni izolati predstavljajo danes po vsem svetu velik problem pri hospitaliziranih bolnikih, v zadnjem času pa se vse več primerov pojavlja pri oskrbovancih domov za ostarele in nehospitaliziranih bolnikih (Wiener in sod., 1999; Baño in sod., 2004).

V našem raziskovalnem delu smo uporabljali 3 zbirke *E. coli* z ESBL. 57 sevov iz zbirke Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana in 10 sevov iz zbirke Bolnišnice Golnik je bilo izoliranih v letih 2000-2007, 22 sevov iz zbirke Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota pa je bilo izoliranih v letih 2005-2007. Poleg tega smo uporabili še zbirko šestih ESBL izolatov, ki so jih zbrali v Bolnišnici Golnik: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila* in 3 izolate bakterije *Proteus mirabilis*. Izolati so bili zbrani tako pri hospitaliziranih, kot tudi pri nehospitaliziranih bolnikih. Sevi z ESBL se v Sloveniji torej ne pojavljajo le v bolnišničnem okolju.

ESBL so encimi, ki cepijo amidno vez v β -laktamskem obroču pri penicilinih, monobaktamih, cefalosporinih prve, druge, tretje in nekaterih cefalosporinih četrte generacije (Bush in sod., 1995). Encime ESBL na podlagi aminokislinskega zaporedja delimo v štiri glavne skupine (TEM, SHV, OXA, CTX-M), poznanih pa je še mnogo manj pogostih skupin. Večina ESBL leta 1995 so bile različice TEM-1 in SHV-1 β -laktamaz

(Bush in sod., 1995), danes pa so najbolj razširjene β -laktamaze, ki spadajo v skupino CTX-M (Bonnet, 2004). Hitro naraščanje deleža skupine CTX-M je najverjetneje posledica koseleksijskih procesov, saj so na plazmidih, ki kodirajo encime te skupine pogosto še zapisi, ki posredujejo rezistenco proti ostalim protimikrobnim spojinam (aminoglikozidom, kloramfenikolu, trimetoprimu, sulfonamidom in tetraciklinu), v zadnjem času pa jih pogosto povezujejo tudi s plazmidno posredovano rezistenco proti kinolonom (PMQR).

Medtem ko iz celega sveta poročajo o prevladi CTX-M skupine med ESBL (Bonnet in sod., 2004; Livermore in sod., 2006; Pitout in sod., 2007; Perez in sod., 2007)), pa sta iz Slovenije znani le dve poročili o sevih iz skupin ESBL. Juteršek in sodelavci (2003) so poročali o skupini SHV med ESBL izolati *K. pneumoniae*, o encimih iz ostalih skupin pa niso poročali. Meško Meglič in sodelavci pa so pred kratkim (2008) izdali prvo objavo o prisotnosti CTX-M skupine v Sloveniji. Med 177 ESBL izolati *K. pneumoniae*, izoliranih v letih 2005 in 2006, so pri 60 (34 %) odkrili encime skupine CTX-M. S sekvenciranjem PCR pomnožkov so ugotovili, da gre za encime prve podskupine, za encim CTX-M-15. Izolati so bili zbrani v osmih bolnišnicah, s čimer so potrdili, da so encimi CTX-M skupine razširjeni po vsej Sloveniji.

V naši raziskavi smo preverjali prisotnost štirih glavnih skupin ESBL (TEM, SHV, OXA in CTX-M). Pri kar 74 odstotkih izolatov *E. coli* smo našli zapis za več kot eno skupino ESBL. V preglednem članku so že Baquero in sodelavci (2008) ugotovili, da delež izolatov z zapisom za več kot eno β -laktamazo narašča. Zapis za β -laktamaze skupine TEM smo odkrili pri kar 70,4 odstotkih izolatov, skupino CTX-M pri 59,3 odstotkih izolatov, skupino OXA pri 40,7 odstotkih in skupino SHV pri 22,2 odstotkih izolatov.

Deleža TEM in SHV pozitivnih izolatov se v letih 2000 do 2007 nista bistveno spreminjala. Med ustanovami, od koder izvirajo sevi tudi ni velikih razlik v pogostosti teh dveh skupin. Edina razlika je odsotnost SHV skupine v izolatih Bolnišnice Golnik, kar pa je najverjetneje posledica premajhnega števila izolatov in že tako nizkega deleža skupine SHV.

Delež CTX-M pozitivnih izolatov med *E. coli* v letih 2005 do 2006 iz naših treh zbirk je znašal kar 62 odstotkov in je torej bistveno večji od deleža med *K. pneumoniae* (34 odstotkov) (Meško Meglič in sod., 2008). Podskupina CTX-M-1 se je prvič pojavila leta 2001 v zbirki IVZ Ljubljana, v ostalih dveh zbirkah pa leta 2005 (ZZV Murska Sobota) in 2006 (Bolnišnica Golnik), vendar pa ne moremo trditi, da se je skupina razširila iz osrednje slovenske regije navzven, saj imamo za časovno obdobje 2001-2004 le izolate iz IVZ Ljubljana. Podskupina CTX-M-1 je še posebej pogosta med izolati iz IVZ Ljubljana, saj je delež pozitivnih izolatov iz leta 2006 skoraj 90 odstotkov.

Pri naši raziskavi smo prvi v Sloveniji odkrili tudi CTX-M-2 pozitivne izolate, ki so se prvič pojavili leta 2006 v zbirki iz ZZV Murska Sobota in v zbirki iz Bolnišnice Golnik. V letu 2007 pa se je CTX-M-2 pozitivni izolat pojavil tudi v zbirki IVZ Ljubljana.

V vseh treh zbirkah je opaziti trend naraščanja deleža CTX-M pozitivnih izolatov. V naši zbirki z 49,4 odstotki prevladuje podskupina CTX-M-1, v podskupino CTX-M-2 pa smo uvrstili 11,1 odstotek vseh sevov. Časovno gledano pa skupina CTX-M med slovenskimi ESBL izolati bakterije *E. coli* prevladuje že od leta 2006.

Skupina OXA se je v naši zbirki pojavila leta 2001 v zbirki iz IVZ Ljubljana. Zapis za encime ESBL te skupine smo odkrili pri 40,7 odstotkih sevov, in razen pri dveh izolatih, se vedno pojavlja pri CTX-M-1 pozitivni izolatih. Poleg tega pa se tako kot pri klebsielah (Ambrožič Avguštin, neobjavljeno) tudi pri izolatih bakterije *E. coli* skupina OXA skoraj vedno pojavlja skupaj z genom za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze.

V raziskavi smo preverjali tudi prisotnost β -laktamaz skupine DHA vendar jih nismo našli.

Geni za ESBL so ponavadi kodirani na plazmidih. Ker so plazmidi konjugativni elementi, se lahko prenašajo med bakterijami iste vrste ali celo med različnimi bakterijskimi vrstami. (Bradford in sod., 2004). Na plazmidih so poleg *bla* genov pogosto še zapisi za rezistenco proti aminoglikozidom, sulfmetoksazol-trimetoprimu in ostalim protimikrobnim sredstvom. Pri sevih z ESBL tako poleg karbapenemov kinoloni ostajajo eno redkih še razpoložljivih protimikrobnih sredstev za zdravljenje.

Do 1998 leta, ko so Martinez-Martinez in sodelavci opisali gen *qnr*, je veljalo, da rezistenca proti kinolonom ne more biti plazmidno kodirana. Danes so poznani že trije mehanizmi PMQR. Prvi je rezistenca z zaščito tarčnega mesta, ki jo posredujejo geni *qnr*, drugi način je rezistenca s kemijsko modifikacijo kinolonov, ki jo posreduje mutirana različica gena za aminoglikozid acetiltransferazo (*aac(6')-Ib-cr*), tretji način pa je izločanje antibiotika z membransko črpalko, ki ga omogoča črpalka QepA (Poirel in sod., 2008). Ker PMQR posredujejo stopnjo rezistence, ki ni klinično opazna, je v medicinskih krogih tem mehanizmom namenjene premalo pozornosti. Zaenkrat je stopnja rezistence, ki jo omogočajo zapisi na plazmidih resda nizka, vendar pa lahko skupaj z mutacijami v kromosomskih genih omogoča selekcijo visoko rezistentnih sevov (Jacoby, 2005).

V naši raziskavi smo želeli preveriti ali so ti trije mehanizmi pri slovenskih ESBL izolatih *E. coli* prisotni, kako pogosti so ter kakšni so krajevni in časovni trendi v pojavljanju in pogostosti teh genov.

Razširjenost genov *qnr* je danes že globalna. O njih poročajo iz vseh naseljenih kontinentov (Robicsek in sod., 2006; Minarini in sod., 2008). Kljub temu pa v Sloveniji do sedaj še niso bili odkriti. Prisotnost gena *qnrA* med uropatogenimi *E. coli* je preverjala že Žerjavič (2006), prisotnost genov *qnrA*, *qnrB* in *qnrS* med bakterijami rodu *Klebsiella* pa Keber (2007), vendar jih nista našla. Tako smo v naši raziskavi prvi v Sloveniji odkrili gen *qnrS*. Da bi se prepričali, da ne gre za nespecifičen produkt, smo PCR pomnožek poslali na sekvenciranje in nato s primerjanjem nukleotidnih sekvenc potrdili, da gre za gen *qnrS*. Gen *qnrS* smo našli pri za ciprofloksacin občutljivem izolatu. O prisotnosti genov *qnr* med izolati občutljivimi za klinično koncentracijo kinolonov so poročali že Robicsek in sodelavci (2006) ter Jacoby in sodelavci (2005). Prvič so o prisotnosti vseh treh *qnr* genov leta 2008 poročali tudi iz Madžarske (Szabó in sodelavci, 2008). To morda nakazuje smer od koder je gen *qnrS* prišel v Slovenijo, saj je bil pozitiven sev izoliran v ZZV Murska Sobota, ki je od vseh treh ustanov, katerih zbirke smo pregledovali, najbližje Madžarski. Genov *qnrA* in *qnrB* nismo našli pri nobenem izolatu.

Gene *qnr* avtorji pogosto povezujejo s skupinami ESBL (Poirel in sod., 2006; Robicsek in sod., 2006a). Poirel in sodelavci (2006) tako gen *qnrA* povezuje z VEB, SHV in CTX-M-1

skupino, gen *qnrS* pa s skupinami TEM, SHV in CTX-M-1. Tudi *qnrS* pozitivni izolat iz naše zbirke smo uvrstili v skupini TEM in CTX-M-1.

Druga PMQR determinanta je mutirana različica gena za aminoglikozid acetiltransferazo (*aac(6')-Ib-cr*), ki so jo prvič izolirali Wang in sodelavci (2003) na Kitajskem. Robiczek in sodelavci (2006b) so ugotovili, da je razširjenost gena *aac(6')-Ib-cr*, kljub temu da je bil odkrit kasneje, večja kot razširjenost gena *qnrA*. V Sloveniji sta edini raziskavi o prisotnosti gena *aac(6')-Ib-cr* izvedla Ambrožič in sodelavci (2007) ter Keber (2007). Proučevali so zbirko uropatogenih ESBL izolatov rodu *Klebsiella*. Zapis za gen *aac(6')-Ib* so našli pri 43,7 odstotkih sevov, zapis *aac(6')-Ib-cr* pa pri 32 odstotkih sevov. Proučevali so, zakaj se je z leti število intermediarno občutljivih sevov za ciprofloksacin zmanjšalo, število sevov rezistentnih proti ciprofloksacinu pa narastlo. Ugotovili so, da je to najverjetneje posledica večjega deleža plazmidno kodiranega alela *aac(6')-Ib-cr*.

O prisotnosti gena *aac(6')-Ib-cr* med *E. coli* v Sloveniji ni poročal še nihče. V naši raziskavi smo preverili prisotnost obeh različic gena pri vseh sevih. Prvič se je mutirana različica alela pojavila leta 2001 v zbirki iz IVZ Ljubljana, kar je leto kasneje kot pri zbirki klebsiel (Keber, 2007). V zbirki iz Murske Sobote se mutiran alel pojavi leta 2005, v zbirki iz Golnika pa leta 2006. Vendar pa je potrebno poudariti, da izolatov izpred leta 2000 (v zbirki iz ZZV Murska Sobota pa izpred 2005) v naši raziskavi nismo imeli, zato ne moremo z gotovostjo trditi, kdaj in kje se je pri slovenskih izolatih *E. coli* pojavila mutirana različica gena za aminoglikozid acetiltransferazo. Gen *aac(6')-Ib-cr* smo odkrili pri 43,2 odstotkih izolatov, gen *aac(6')-Ib* pa pri 12,3 odstotkih izolatov *E. coli*. Najmanjši delež *aac(6')-Ib-cr* pozitivnih izolatov je v zbirki iz Murske Sobote (9,1 odstotek), največji pa v zbirki iz IVZ Ljubljana (63,2 odstotka). V zbirki *E. coli* iz Golnika smo gen *aac(6')-Ib-cr* našli pri 20 odstotkih sevov. Celokupno smo opazili trend v smeri naraščanja deleža izolatov z zapisom za mutirano različico alela in upadanja deleža izolatov z alelom divjega tipa.

Različni avtorji PMQR determinante pogosto povezujejo s sevi ESBL, vendar je večina raziskav usmerjena le v gene *qnr*, saj ti posredujejo večji dvig rezistence proti fluorokinolonom. Manj je znanega o skupinah ESBL, ki imajo na plazmidih prisoten še zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze. Pri ESBL sevih iz rodu

Klebsiella izoliranih v Sloveniji se *aac(6')-Ib-cr* skoraj vedno pojavlja na plazmidu skupaj z *bla_{OXA-1}* (Ambrožič Avguštin, neobjavljeno). Tudi v naši raziskavi smo ugotovili, da se *aac(6')-Ib-cr* v 88,6 odstotkih pojavlja pri izolatih, ki imajo zapis za β -laktamaze skupine OXA-1.

Prisotnost PMQR smo preverjali tudi pri ne *E. coli* izolatih. Pri izolatih bakterije *Aeromonas hydrophila* smo odkrili zapis za nemutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze o čemer so nedavno poročali iz Kitajske (Qu in Mao, NCBI protein).

Tretji tip PMQR je membranska črpalka QepA, ki so jo leta 2007 opisali Yamane in sodelavci. Po dosedaj objavljenih podatkih še ni zelo razširjena, saj so o njej poročali le iz Japonske, Kitajske in Belgije (Perichon, 2007; Ma in sod., 2008). Iz Francije pa so poročali o različici te črpalke, ki so jo poimenovali QepA2 (Cattoir in sod., 2008). Ni pa še jasno, ali je nizka razširjenost *qepA* posledica premalo pregledanih sevov ali dejanske odsotnosti gena. V naših zbirkah smo preverjali prisotnost gena za črpalko QepA, vendar ga nismo našli.

V naši raziskavi nas je zanimala tudi razporeditev rezistenčnih genov med različnimi filogenetskimi skupinami *E. coli*. Bakterije vrste *E. coli* na podlagi treh fragmentov DNA (*chuA*, *yjaA* in TSPE4.C2) lahko uvrstimo v filogenetske skupine. Avtorji izvenčrevesne patogene seve *E. coli* večinoma uvrščajo v filogenetsko skupino B2 (skoraj dve tretjini sevov) in v manjši meri v skupino D (Zhang in sod., 2002; Picard in sod., 1999). Med komezalnimi sevi pa sta najpogostejši skupini A in B1 (Zhang in sod., 2002). Branger in sodelavci (2005) pa poročajo, da se delež skupine B2 med sevi, ki izločajo ESBL zmanjša, delež skupin D in A pa poveča. Med ESBL izolati bakterije *E. coli* so v skupino B2 uvrstili 36,4 % sevov (od tega 8,5 % v podskupino B2₂ in 27,9 % v podskupino B2₃), v skupino D 25,5 % sevov (17 % podskupina D₁, 8,5% D₂) v skupino A 27,9 % sevov (9,3 % A₀ in 18,6% A₁) in v skupino B2 10 % sevov. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi. V Skupino B2 smo uvrstili le 18,5 % (od tega 4,9 % B2₂ in 13,6 % B2₃) izolatov, v skupino D kar 58,1 % izolatov (34,6 % D₁, 23,5 % D₂), v skupino A₁ 16 % in v skupino B1 7,4 % izolatov *E. coli* iz naših zbirk.

Branger in sodelavci (2005) poročajo, da imajo sevi iz skupin B2 in D pogosto zapise za virulentne dejavnike, ki jih sevi iz skupin A in B1 nimajo. Johnson in sodelavci (1991) pa so opazili, da sevi *E. coli*, ki ne spadajo v filogenetsko skupino B2 pogosteje nosijo zapise za rezistenco proti protimikrobnim sredstvom (ampicilinu, tetraciklinu, kloramfenikolu, streptomycinu in sulfonamidom) ter imajo prisotnih manj virulentnih faktorjev. Da bi preverili, če je tako tudi pri naših sevih, smo pri izolatih bakterije *E. coli* iz zbirke ZZV Murska Sobota in Bolnišnice Golnik preverili prisotnost desetih virulentnih dejavnikov. Največ virulentnih dejavnikov so imeli izolati skupine B2₃ (v povprečju 3,4), sledila je skupina D₁ (v povprečju 2,9) in D₁ (s povprečjem 2,3 virulentna dejavnika na sev), najmanj virulentnih dejavnikov pa so imeli izolati iz filogenetske skupine A₁ (v povprečju 1,4) in B1 (v povprečju 1,5). Naši podatki so se skladali z ugotovitvami avtorjev. Povprečno število virulentnih dejavnikov na posamezen sev je bilo sicer nizko (2,5), vendar smo to tudi pričakovali, saj smo pregledovali rezistentne seve, za katere je značilna nizka virulenca (Branger in sod., 2005).

Vsi sevi so imeli zapis *fimH*, kar smo, glede na to da gre za najpogostejši adhezini uropatogenih sevov *E. coli*, ki ima vlogo pri invaziji tkiv (Mulvey, 2002; Martinez in sod., 2000) tudi pričakovali. 78,1 odstotek sevov je imelo zapis *kpsMT II*, 50 odstotkov je imelo zapis *iha*. Zapise *hra*, *iss* in *hlyA* je imelo 6,3 odstotkov sevov, zapis *ibeA* pa 3,1 odstotek sevov. Zapisov *EHEChly*, *cnf* in *neuC* nismo našli pri nobenem sevu.

Prisotnost vseh zgoraj naštetih virulentnih dejavnikov smo preverili tudi pri ne *E. coli* ESBL izolatih (7Ah, 8 Sm, 9Sm, 10SM, 11Pm, 17Ab), vendar jih pri teh sevih nismo zasledili.

S konjugacijami smo želeli preveriti ali so rezistence, ki jih imajo sevi iz zbirk prenosljive. Konjugacije donorskih sevov *E. coli* iz zbirk z recipientskim sevom *E. coli* J53Az^r so se izkazale za rezmeroma težavne. Morali smo prilagajati koncentracijo natrijevega azida za kontraselekcijo proti donorju, vendar nam kljub večkratnim poskusom determinant za rezistenco ni uspelo prenesti pri vseh sevih. Pri vseh transkonjugantah smo z reakcijo PCR določili filogenetsko skupino, ki je morala biti ista kot pri recipientskemu sevu. Tako smo zagotovili, da so bile konjugacije uspešne. Plazmide nam je uspelo prenesti iz 46 donorskih sevov.

Pri vseh transkonjugantah smo s pomočjo Etestov preverili, če nam je poleg rezistence za β -laktamske antibiotike uspelo prenesti tudi rezistenco proti ciprofloksacinu. Avtorji PMQR namreč pogosto povezujejo s plazmidi, ki kodirajo ESBL (Poirel in sod., 2006; Robicsek in sod., 2006a). Pri primarnih transkonjugantah 10 sevov se je MIC glede na recipientski sev (0,008 $\mu\text{g/ml}$) povišala 8-krat. Pri enem sevu se je povišala 12-krat pri enem 16-krat. Pri petih sevih se je zvišala 6-krat in pri enem sevu 4-krat (0,032 $\mu\text{g/ml}$). Pri donorskih sevih vseh teh transkonjugant je bil prisoten alel za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze. Glede na to, da prisotnosti ostalih PMQR determinant pri teh sevih nismo zasledili, smo sklepali, da je dvig rezistence posledica prisotnosti gena *aac(6')-Ib-cr* na prenešenem plazmidu.

Pri petnajstih transkonjugantah se je MIC dvignila od 1,5-krat do 3-krat. Glede na odsotnost do sedaj znanih PMQR pri donorskih sevih teh transkonjugant, nismo ugotovili, kaj je povzročilo dvig MIC. Pri trinajstih transkonjugantah se MIC za ciprofloksacin pri transkonjugantah ni povišala. Pri teh sevih PMQR pri donorskih organizmih večinoma niso bile prisotne. Če pa so bile, nam jih s konjugacijo ni uspelo prenesti v recipientski sev. Možno je namreč, da ima donorski sev več kot en tip plazmida in nam ni uspelo izbrati vseh transkonjugant.

Pri sevu MS18, ki je bil izoliran leta 2007 v ZZV Murska Sobota, smo odkrili prisotnost gena *qnrS*, vendar nam te PMQR determinante ni uspelo prenesti v donorski sev. Pri transkonjuganti MS18/3 namreč ni prišlo do dviga MIC za ciprofloksacin. Zaradi pomanjkanja časa (sekvenco *qnrS* smo dobili šele, ko smo že zaključili z laboratorijskim delom), konjugacij nismo ponovili še enkrat.

Da bi ugotovili, ali gre pri naših izolatih za klonalne linije sevov, smo izbranim sevom iz zbirke IVZ Ljubljana z metodo PFGE določili restrikcijski profil genomske DNA. Profil smo uspešno določili 17 sevom, za katere se je izkazalo da spadajo v 11 različnih razredov. Klonalna razširjenost sevov med našimi izolati je bila torej razmeroma nizka.

Preverili smo tudi, če obstaja podobnost med plazmidi klonalno nepovezanih sevov. Iz 21 transkonjugant, katerih donorski sevi so bili iz zbirke IVZ Ljubljana, smo izolirali plazmidno DNA, ki smo jo nato razrezali z encimom *PstI*. Na podlagi analize fragmentov

restriksijskega profila plazmidov smo jih razdelili v tri skupine. Plazmida v skupini 1 sta imela enak restriksijski profil. 13 plazmidov, katerih osnovni restriksijski profil je bil podoben, smo uvrstili v skupino 2. Skupino 2 smo nato razdelili v 4 podskupine: plazmidi podskupin 2a, 2b in 2c so imeli enake restriksijske profile, plazmidi skupine 2d pa podobne. Šest plazmidov, ki smo jih uvrstili v 3 skupino, je imelo različne restriksijske profile ali pa jih zaradi premalo vidnih fragmentov nismo mogli uvrstiti v skupine. Na podlagi podobnosti med plazmidi (predvsem iz skupine 2), smo ugotovili, da so med klonalno nepovezanimi sevi ESBL prisotni isti ali vsaj podobni plazmidi. Klonalno nepovezanost med sevi smo deloma preverili z PFGE, deloma pa z uvrstitvijo sevov v filogenetske skupine, saj so ti zapisi prisotni na kromosomu.

Ker so mnogi avtorji že poročali o kroženju plazmidov, ne le znotraj bakterij iste vrste, temveč celo med bakterijami različnih rodov (Marchandin in sod., 1999), smo primerjali restriksijske profile plazmidov pridobljenih iz ESBL sevov bakterije *E. coli* in rodu *Klebsiella*. ESBL izolati obeh zbirk so bili zbrani v istem časovnem obdobju na IVZ Ljubljana. Restriksijske profile plazmidov, ki smo jih pridobili v naši raziskavi smo primerjali s profilom plazmidov, ki jih je v svojem diplomskem delu izoliral Keber (2007). Ugotovili smo, da so profili plazmidov podobni, v nekaterih primerih celo enaki. Iz tega sklepamo, da plazmidi, ki posredujejo rezistenco proti mnogim protimikrobnim učinkovinam, ne krožijo le med bakterijami *E. coli*, temveč tudi med ostalimi enterobakterijami.

5.1 SKLEPI

- ❖ V diplomskem delu smo primerjali 3 zbirke bakterij *E. coli* z ESBL. 57 sevov iz zbirke Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana in 10 sevov iz zbirke Bolnišnice Golnik je bilo izoliranih v letih 2000-2007, 22 sevov iz zbirke Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota pa je bilo izoliranih v letih 2005-2007.
- ❖ Pri vseh izolatih smo preverili prisotnost skupin β -laktamaz in ugotovili, da ima β -laktamaze skupine TEM 70,4 % izolatov, skupine SHV 22,2 %, skupine OXA 40,7 %, skupine CTX-M pa 59,3 % izolatov. Skupine DHA nismo odkrili pri nobenem izolatu. Pri CTX-M pozitivnih izolatih smo nadalje določili podskupine. V

podskupino CTX-M-1 smo uvrstili 49,4 % izolatov, v podskupino CTX-M-2 pa 11,1 % izolatov.

- ❖ β -laktamaze podskupine CTX-M-1 so se prvič pojavile leta 2001 v zbirki iz IVZ Ljubljana, podskupine CTX-M-2 pa leta 2006 v zbirki iz Bolnišnice Golnik in ZZV Murska Sobota. Število sevov z zapisom za β -laktamaze obeh podskupin je v porastu.
- ❖ Med ESBL izolati bakterije *E. coli* od leta 2006 prevladuje skupina CTX-M.
- ❖ Pri enem sevu iz zbirk smo odkrili zapis za rezistenco proti kinolonom *qnrS*, zapisev *qnrA* in *qnrB* nismo odkrili.
- ❖ Pri 54,3 % bakterij *E. coli* z ESBL iz zbirk smo odkrili zapis za aminoglikozid acetiltransferazo, od tega je bil divji tip prisoten pri 12,3 %, mutirana različica, ki posreduje nizko stopnjo rezistence proti fluorokinolonom pa pri 43,2 % izolatov.
- ❖ Zapisa *qepA* nismo odkrili pri nobenem sevu iz zbirk.
- ❖ Zaradi ugotavljanja klonalne povezanosti med izolati smo seve uvrstili v filogenetske skupine in preverjali prisotnost nekaterih virulentnih dejavnikov. Pri izbranih izolatih pa smo za ugotavljanje klonalne povezanosti uporabili metodo PFGE, s katero smo ločili z encimom *XbaI* razrezano genomsko DNA.
- ❖ Pri primarni konjugaciji donorskih *E. coli* iz zbirke z recipientskim sevom J53 Az^r se je rezistenca proti ciprofloksacinu prenesla pri 32 sevih. Pri vseh transkonjugantah, kjer je bil dvig MIC glede na recipientski sev vsaj štirikrat višji, smo pri donorskih sevih zasledili zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze. Pri nekaterih izolatih, kljub dvigu MIC pri transkonjugantah, nismo zasledili do sedaj poznanih PMQR.
- ❖ Z restrikcijsko analizo plazmidne DNA izolirane iz transkonjugant, elektroforezo genomske DNA donorskih sevov v utripajočem polju in določanjem filogenetskih skupin donorskih sevov smo pokazali, da plazmidi krožijo med klonalno nepovezanimi sevi bakterije *E. coli*.
- ❖ S primerjavo restrikcijskih profilov plazmidov iz ESBL izolatov *E. coli* in rodu *Klebsiella* smo ugotovili, da plazmidi v slovenskih ESBL sevih krožijo tudi med bakterijami različnih rodov.

6 POVZETEK

V Sloveniji se predvsem med pacienti z infekcijami sečil pojavlja vse več bakterijskih izolatov, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL). Zapisi, ki omogočajo rezistenco proti betalaktamskim antibiotikom, so največkrat na konjugativnih plazmidih. Pogosto se pojavljajo skupaj z zapisi, ki posredujejo rezistenco proti aminoglikozidom, trimetoprim-sulfmetoksazolu in še nekaterim protimikrobnim sredstvom. Posebno skrb vzbujajo sevi, ki na plazmidih poleg vseh teh rezistenc nosijo še zapise, ki posredujejo rezistenco proti kinolonom (PMQR).

V zadnjem času povsod po svetu med sevi, ki izločajo ESBL opažajo naraščanje in prevlado skupine CTX-M β -laktamaz. To skupino še posebej pogosto povezujejo z izvenbolnišničnimi okužbami in PMQR. Med PMQR determinante uvrščamo gene *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* in *aac(6)-Ib-cr*. Da bi preverili, če je situacija podobna tudi med slovenskimi izolati *E. coli*, smo preverili prisotnost skupin ESBL (CTX-M, OXA, SHV in TEM) in determinant PMQR. Ugotovili smo, da se med slovenskimi ESBL izolati *E. coli* pojavlja vedno večji delež skupine CTX-M, ki že od leta 2006 prevladuje. Odkrili smo, da se delež izolatov z genom *aac(6)-Ib-cr* povečuje. Pri enem od izolatov smo odkrili tudi gen *qnrS*, kar kaže na to, da so geni *qnr* prodrli tudi že v Slovenijo.

S konjugacijo smo prenesli plazmidno kodirane determinante, ki omogočajo rezistenco proti fluorokinolonom, v recipientski sev. Plazmide nekaterih sevov, pri katerih nam je uspelo prenesti rezistenco, smo razrezali in primerjali med seboj. Z metodo PFGE in uvrščanjem v filogenetske skupine smo preverili ali so sevi med sabo klonalno povezani ali ne. Ugotovili smo, da je kroženje plazmidov med klonalno nepovezanimi sevi vsaj delno krivo za pojav visoko rezistentnih sevov med slovenskimi izolati enterobakterij.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Amabile-Cuevas C. F. 2007. Antimicrobial resistance in bacteria. Norfolk.

HorizonBioscience

Ambler, R. P., Coulson A. F., Frere J., Ghuisen J., Joris B., Forsman M., Levesque R.,
Tiraby G., Waley S. 1992. A standard numbering scheme for the class A β -
lactamases. *Biochemical Journal*, 276: 269-270

Ambrožič Avguštin J., Keber R., Žerjavič K., Oražem T., Grabnar M. 2007. Emergence of
the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum- β -
lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and
2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 11: 4171–4173

Anderson G. G., Dodson K. W., Hooton T. H., Hultgren S. J. 2004. Intracellular bacterial
communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis.
Trends in Microbiology, 12, 9: 424-430

Bahrani-Mougeot F., Gunther IV N. W., Sonnenberg S. M., Moobley H. L. T. 2002.
Uropathogenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a*
Versatile Pathogen. Chapter 8: 239-295

Baño J. R., Navarro M. D., Romero L., Martinez-Martinez L., Muniain M. A., Perea E. J.,
Perez-Cano R., Pascual A. 2004. Epidemiology and clinical features of infections
caused by extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in
nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1089-1094

Baquero F., Nombela C., Cassel G. H., Gutierrez J. A. 2008. *Evolutionary Biology of*
Bacterial and Fungal Pathogens. Washington D. C., ASM Press

Barlow M., Reik R. A., Jacobs S. D., Medina M., Meyer M. P., McGowan J. E. Jr.,
Tenover F. C. 2008. High Rate of mobilization for *bla*_{CTX-MS}. *Emerging Infectious*
Diseases, 14: 423-428

Barthelemy M., Peduzzi J., Labia R. 1985. Distinction entre les structures primaires des β -
lactamases TEM-1 et TEM-2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 136A: 311-321

Barnard F. M., Maxwell A. 2001. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects

- of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1994-2000
- Bekal S., Brousseau R., Masson L., Prefontaine G., Fairbrother J., Harel J. 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5: 2113-2125
- Blattner F. R., Plunkett G. III, Bloch C. A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides N., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Dawis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277: 1453-1462.
- Bonnet R., Sampaio J. L. M., Labia R., Champs C. D., Sirot D., Chanel C., Sirot J. 2000. A novel β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1936-1942
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48,1: 1-14
- Boyd D. A., Tyler S., Christianson S., McGeer A., Muller M. P., Willey B. M., Bryce E., Gardam M., Nordmann P., Mulvey M. R. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:3758-3764
- Bradford P. A., Cherubin C. E., Idemyor V., Rasmussen B. A., Bush K. 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 761-766
- Bradford P. A. 2001. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterisation, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 933-951
- Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., Laurans G., Arlet G., Thien H. V., Gouriou S., Picard B., Denamur E. 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum β -lactamase type. *Emerging Infectious diseases*, 11, 1: 54-61
- Bret L., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. 1996. Characterisation of an inhibitor-

- resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 38:183-191
- Bush K, Singer S. B. 1989. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. *Infection*, 17: 429-433
- Bush K., Jacoby G. A, Madeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233
- Canton R., Coque T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 466- 457
- Car J., Marinko T. 2003. Zdravljenje nezapletene okužbe sečnega mehurja pri ženskah v družinski medicini. *Zdravstveni vestnik*, 72: 79-83
- Caselas J. M., Tome G., Bantar C., Bertolini P., Blazquez N., Borda N., Couto E., Cudmani N., Guerrero J., Juarez M. J., Lopez T., Littvik A., Mendez E., Notario R., Ponce G., Quinteros M., Salamone F., Sparo M., Sutich E., Vaylet S., Wolff L. 2003. Argentinean collaborative multicenter study on the in vitro comparative activity of piperacilin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 47:247-257
- Cattoir V., Poirel L., Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 10: 3801-3804
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558
- Deguchi T., Fukuoka A., Yasuda M. 1997. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:699-701
- Drlica K. 1999. Mechanism of fluoroquinolon action. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 5: 504-509
- Ellington M. J., Woodford N. 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:1026-1029

- Greenwood D. 2003. β -lactam antibiotics: β -lactamases. V: Antibiotics and chemotherapy. Anti-infective agents and their use in therapy. 8th ed. Churchill Livingstone, 185-223
- Gubina M., Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana, Medicinski razgledi
- Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49,2:801-803
- Hayasi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa S., Ishii K., Yokoyama K., Han C. G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA research, 8, 1; 11-12
- Helfand M. S., Bonomo R. A. 2006. Extended-spectrum β -lactamases in multidrug-resistant *Escherichia coli*: Changing the Therapy for Hospital-Acquired and Community-Acquired Infections. Clinical Infectious Diseases, 43: 1415–1416
- Hooper D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clinical Infectious Diseases, 31: 24-28
- Huang S., Stins M. F., Kim K. S. 2000. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. Microbes and Infection. 2, 10: 1237-1244
- Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., Philippon A. 2002. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid encoded CTX-M types. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46: 3045—3049
- Jacoby G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clinical Infectious Diseases, 41, 2: 120-126
- Jacoby G. A., Madeiros A. A. 1991. More extended spectrum β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39: 1697-1704
- Jacoby G. A., Muñoz-Price L. S. 2005. The New β -Lactamases. The New England Journal of Medicine, 352: 380-391

- Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon, A. 1998. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10:867–78
- Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clinical Microbiology reviews*, 4, 1: 80-128
- Juteršek B., Baraniak A., Žohar-Čretnik T., Štorman A, Sadowy E, Gniadkowski M. 2003. Complex endemic situation regarding extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Slovenia. *Microbiology and Drug Resistance*, 9 (Suppl 1): S25-33
- Keber R. 2007. Rezistenca proti kinolonom, integroni in klebicini uropatogenih ESBL sevov bakterij iz rodu *Klebsiella*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Leveille S., Caza M., Johnson J. R., Clabots C., Sabri M., Dozois C. M. 2006. Iha from *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infectin and Immunity*, 74, 6: 3427-3436
- Lewis II J. S., Herrera M., Wickes B., Patterson J. E., Jorgensen J. H. 2007. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBL) as the predominant ESBL isolated in a U. S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 11: 4015-4021
- Li J., Nation R. L., Turnidge J. D., Milne R. W., Coulthard K., Rayner C. R., Paterson D. L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram negative bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, 6, 9: 589-601
- Livermore D. M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 557-584
- Livermore D. M. 1998. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 25-41
- Livermore D. M., Williams J. D. 1996. β -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. V: *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th edition. Lorain V. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins: 502-578

- Ma J., Zeng Z., Chen Z., Xu X., Wang X., Deng Y., Lü D., Huang L., Zhang Y., Liu J., Wang M. 2008. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* among ceftiofur-resistant enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Madeiras A. A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1: 19-45
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice-Hall international
- Mammeri H., Van De L. M., Poirel L., Martinez-Martinez L., Nordman P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:71-76
- Marchandin H., Carriere C., Sirot D., Jean-Pierre H., Darbas H. 1999. TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 8: 2069-2073
- Marrs C. F., Zhang L., Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* pathotypes? *FEMS Microbiology letters*, 252, 2: 183-190
- Martinez J. J., Mulvey M. A., Schilling J. D., Pinker J. S., Hultgren S. J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, 19, 12: 2803-2812
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby J. A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351: 797-799
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Garcia I., Tran J, Jacoby G. A. 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *Journal of Antimicrobial Therapy*, 51: 1037-1039
- Meško Meglič K., Koren S., Palepou M. F. I., Karisik E., Livermore D. M., Pike R., Andlovic A., Jeverica S., Križan-Hergouth V., Müller-Premru M., Seme k., Slovenian ESBL Study Group, N. Woodford. 2008. Nationwide survey of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian hospitals.

- Minarini L. A., Poirel L., Cattoir V., Darini A. L., Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Journal of Antimicrobial Therapy*, 62, 3: 474-8
- Mulvey M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4, 5: 257-271
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1999. *Medical Microbiology*. 4th ed. Missouri, Mosby, Inc.
- Nordmann P., Poirel L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 56:453-469
- Owens R. C. Jr., Ambrose P. G. 2000. Clinical use of the fluoroquinolones. *The Medical Clinics of North America*, 84: 1447-1469
- Paterson D. L., Hujer K. M., Hujer A. M., Yeiser B., Bonomo M. D., Rice L. B., Bonomo R. A. and the International *Klebsiella* Study Group. 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3554-3560
- Paterson D. L., Bonomo R. A., 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology reviews*, 18,4: 657-686
- Perez. F., Endimiani. A., Hujer K. M., Bonomo R. A. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*. 7, 5: 459-469
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*; 67(2):546-53
- Pitout J. D. D., Nordmann P., Lauplaud K. B., Poirel L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 52-59
- Poirel L., Rodriguez-Martinez J. M., Mammeri H., Liard A., Nordmann P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 8: 3523-3525
- Poirel L., Leviandier C., Nordmann P. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae

- isolates from a French University hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 12: 3992–3997
- Poirel L., Cattoir V., Nordmann P. 2008. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14, 4: 295-297
- Qu F., Mao Y. L. NCBI protein
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=157713497>
- Robicsek A., Jacoby A. G., Hooper D. C. 2006a. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6: 629-640
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G. A., Macielag M., Abanat D., Hye Park C., Bush K., Hooper D. C. 2006b. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12,1: 83-88
- Russo T. A., Carlino U., Johnson J. R., 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69, 10: 6209-6216
- Schmidt H., Beutin L., Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infection and Immunity*. 63, 3: 1055-1061
- Seme K., Križan-Hergouth V., Müller-Premru M., Andlovic A., Kolman J., Gubina M. 2001. Bakterije z laktamazami beta razširjenega spektra delovanja (ESBL)- rezultat naše raziskave. V: *Mikrobi in antibiotiki 2001*
- Sherley M., Gordon D. M., Collignon P. J., 2003. Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. *Plasmid* 49:79-85
- Shlaes D. M., Rice L. B. 1999. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. V: *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology Press: 1223-1241
- Silva J. 1996. Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*. 57, (Suppl. A): 30-35
- Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology, Washington
- Sougakoff W., Goussard S., Courvailn P. 1988. The TEM-3 β -lactamase, which

- hydrolyzes broad spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiology letters*, 56: 343-348
- Spoering A. L., Lewis K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183: 6746-6751
- Srinivasan U., Foxman B., Marrs C. F. 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1: 285-289
- Stamm W.E., Hooton T.M. 1993. Management of urinary tract infections in adults. *The New England Journal of Medicine*, 329:1328-1334
- Stamm W. E., Norrby S. R. 2001. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183: 1-4
- Stürenburg E., Mack D. 2003. Extended spectrum β -lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *Journal of infection*, 47: 273-295
- Szabó D., Kocsis B., Rókusz L., Szentandrassy J., Katona K., Kristóf K., Nagy K. 2008. First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in Budapest, Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 3: 630-632
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. 2001. *Microbiology: an introduction*. 7th edition. Addison Wesley Longman
- Tran J. H., Jacoby G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 5638-5642
- Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005a. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1: 118-125
- Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005b. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 7: 3050-3052
- Tzouvelekis L. S., Tzelepi E., Tassios P. T., Legakis N. J. 2000. CTX-M type β -

- lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 137- 143
- Vila J., Ruiz J., Navia M. M. 1999. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Recent Research Developments in Antimicrobials and Chemotherapy*, 3:323–44.
- Wang H., Dzink-Fox J.L., Chen M., Levy S.B. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1515-1521
- Wang M., et al. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47: 2242-2248
- Wang M., Sahm D. F., Jacoby G. A., Zhang Y., Hooper D. C. 2004. Activities of Newer Quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Containing the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *qnr*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1400-1401
- Wang M. H., Xu X., Wu S., Zhu D., Wang M.G. 2008. A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance, *qnrC*. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, Spain. Abstract number: O207
- Wiener J., Quinn J. P., Bradford P. A., Goering R. V., Nathan C., Bush K., Weinstein R. A. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA*, 281: 517-523
- Willmott C.J.R., Maxwell A. 1993. A single point mutation in the DNA gyrase. A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37:126-127
- Winokur P. L., Canton R., Casellas J. M., Legakis N. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (Suppl. 2): 94-101
- Yague G., Morris J. E., Pan X. S., Gould K. A., Fisher L. M. 2002. Cleavable complex formation by wild-type and quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* type II

- topoisomerases mediated by gemifloxacin and other fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:413-419
- Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 9: 3354–3360
- Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 4: 1564-1566
- Zapata G., Crowley J. M., Vann W. F. 1992. Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. *Journal of Bacteriology*, 174, 1: 315-319
- Zhang L., Foxman B., Marrs C. 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 11: 3951-3955
- Žerjavič K. 2006. Rezistenca proti kinolonom pri izbranih uropatogenih sevih bakterije *Escherichia coli*, izoliranih na inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani v letih 2000-2005. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

7.2 NECITIRANI VIRI

- Cattoir V., Poirel L., Rotimi V., Soussy C. J., Nordmann P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 394-397
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 10: 4555-4558
- Pitout J. D. D., Hossain A., Hanson N. D. 2004. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical Microbiology*, 42, 12: 5715-5721

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za vodenje pri delu in prilagodljivost. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko, še posebej Fani Oven, prof. dr. Darji Žgur-Bertok, prof. dr. Miklavžu Grabnarju, Gregorju Bajcu in dr. Zdravku Podlesku. Najlepša hvala tudi Brigiti Nograšek za pomoč v laboratoriju in moralno podporo.

Za zbirko sevov se zahvaljujem mag. Viktoriji Tomič in Viktorju Uršiču iz Bolnišnice Golnik in mag. Iztoku Štrumblju iz Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota. Dr. Minki Trkov iz Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije se zahvaljujem za zbirko sevov in sodelovanje pri izvedbi PFGE.

Za finančno in moralno podporo se zahvaljujem družini. Za motivacijo, pomoč in potrpljenje med študijem se najlepše zahvaljujem fantu Blažu. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani.

Priloga C: Antibiogrami izolatov zbranih v IVZ Ljubljana. Kratice za protimikrobna sredstva so iste kot v prilogi A.

izolat	AM	CF	AMC	CTX	CXM	CXMA	SXT	GM	NOR	CRO	CIP	NET	SAM	PIP
IS3341	R	R	R	R	R	R	R	S	R	np	R	R	R	R
IS4452	R	R	R	np	np	np	S	S	S	np	S	np	np	np
IS5017	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
IS5345	R	R	R	np	R	R	R	S	S	R	np	S	np	np
IS631	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R
IS1442	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS1932-1														
IS1932-2														
IS2508	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IS4138	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
IS4197	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
IS653	np	R	R	np	np	np	S	np	S	R	np	R	np	np
IS1790	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
IS3057	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np
IS3713	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	np
IS1770	np	np	R	np	np	np	S	S	np	R	S	S	np	np
IS3209	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	np
IS3729	np	np	R	np	np	np	S	S	np	R	S	S	np	np
IS1002	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS1664	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS2434	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS2920	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS3004	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS4400	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np
IS447	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np
IS1043	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	R	S	R	np
IS1047	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	np
IS2200	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	np
IS4581	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	np
IS1861														
IS4939														
IS5784														
IS539	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	np
IS578														

se nadaljuje...

...nadaljevanje

izolat	AN	OFX	CAZ	IPM	CFP	C	CEC	FM	CTB	ATM	CPO	TZP	TE
IS3341	R	R	R	S	R	np	R	np	np	np	np	np	np
IS4452	np	np	np	np	np	np	R	np	np	np	np	np	np
IS5017	S	R	R	S	R	np	R	np	np	np	np	np	np
IS5345	np	np	np	np	np	np	R	S	np	np	np	np	np
IS631	R	R	R	S	R	np	R	np	np	np	np	np	np
IS1442	R	R	R	S	R	np	R	np	R	np	np	np	np
IS1932-1													
IS1932-2													
IS2508	S	R	R	S	R	np	R	np	np	R	R	np	np
IS4138	R	R	R	S	R	S	R	np	np	np	np	np	np
IS4197	S	R	R	S	R	S	R	np	np	np	np	np	np
IS653	np	np	np	np	np	np	R	S	np	np	np	np	np
IS1790	S	R	R	S	np	np	R	np	np	np	np	np	np
IS3057	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS3713	R	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	S	np
IS1770	np	np	np	np	np	np	R	S	np	np	np	np	np
IS3209	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS3729	np	np	np	np	np	np	R	S	np	np	np	np	np
IS1002	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	S	np
IS1664	S	np	R	S	np	np	R	np	np	np	np	np	np
IS2434	R	np	R	S	np	np	R	np	np	np	np	R	np
IS2920	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS3004	R	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS4400	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS447	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS1043	S	np	I	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS1047	I	np	R	S	np	np	R	np	np	np	np	R	np
IS2200	S	np	S	S	np	np	np	np	np	np	np	S	np
IS4581	S	np	I	S	np	np	np	np	np	np	np	S	np
IS1861													
IS4939													
IS5784													
IS539	S	np	R	S	np	np	np	np	np	np	np	R	np
IS578													

se nadaljuje...

...nadaljevanje

izolat	AM	CF	AMC	CTX	CXM	CXMA	SXT	GM	NOR	CRO	CIP	NET	SAM	PIP
IS1076	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np	R	R	R	np
IS1143	R	R	R	R	R	R	S	R	S	np	S	np	R	np
IS1299	np	np	R	np	np	np	S	S	np	R	S	S	np	np
IS1620	np	R	R	np	np	np	S	S	np	R	R	S	np	np
IS1676	np	np	R	np	np	np	R	S	np	R	R	S	np	np
IS1681	np	np	R	np	np	np	R	S	np	R	R	S	np	np
IS1722	np	np	R	np	np	np	R	S	np	R	R	S	np	np
IS2066	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np	I	np	R	np
IS2177	R	R	R	R	R	R	S	R	R	np	R	np	R	np
IS3045	R	R	R	np	np	np	R	R	R	R	R	N	np	np
IS3339	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	np
IS3976	R	R	R	R	R	R	S	R	R	np	R	np	R	np
IS4219	np	np	R	np	np	np	R	S	R	R	R	S	np	np
IS4128	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np	R	np	R	np
IS4287	np	np	R	np	np	np	R	S	np	R	R	S	np	np
IS4570														
IS4640	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np	R	R	R	np
IS4861	np	np	R	np	np	np	R	S	np	R	R	S	np	np
IS49-1														
IS85-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	np
IS134														
IS2006														
IS5076														

se nadaljuje...

