

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok Keber

**REZISTENCA PROTI KINOLONOM, INTEGRONI IN  
KLEBICINI UROPATOGENIH ESBL SEVOV BAKTERIJ IZ  
RODU *Klebsiella***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok KEBER

**REZISTENCA PROTI KINOLONOM, INTEGRONI IN KLEBICINI  
UROPATHOGENIH ESBL SEVOV BAKTERIJ IZ RODU *Klebsiella***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**QUINOLONE RESISTANCE, INTEGRONS AND KLEBICINS OF  
UROPATHOGENIC ESBL *Klebsiella* STRAINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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 mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Miklavž Grabnarja, za somentorico asist. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. Miklavž Grabnar

Somentorica: asist. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Nina Gunde Cimerman  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Keber

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn  
DK 577.27:579.61:616.6(043.2)=863  
KG *Klebsiella* sp./odpornost proti kinolonom/*qnr*/ESBL/aminoglikozid acetiltransferaza/  
*aac(6')-Ib-cr*  
AV KEBER, Rok  
SA GRABNAR, Miklavž (mentor)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (somentorica)/  
ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2007  
IN REZISTENCA PROTI KINOLOMOM, INTEGRONI IN KLEBICINI  
UROPATOGENIH ESBL SEVOV BAKTERIJ IZ RODU *Klebsiella*.  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 89 str., 14 pregl., 8 sl., 75 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Pri 103 sevih iz zbirke klebsiel z ESBL, izoliranih v Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani, med leti 2000-2005 smo raziskovali porast rezistence proti kinolonom. S PCR smo preverili prisotnost plazmidno kodiranih zapisov *qnrA*, *qnrS* in *qnrB* za rezistenco proti kinolonom. Iskanih genov nismo uspeli pomnožiti iz nobenega od 103 preiskovanih sevov. S konjugacijo smo skušali prenesti determinantno rezistence proti kinolonom iz 103 donorskih sevov klebsiel z ESBL v recipientski sev *E. coli J53 Az<sup>r</sup>*. Prenos je uspel pri 27 sevih, pri katerih se je MIC transkonjugante za ciprofloksacin v primerjavi z recipientskim sevom povišala za 2 do 16-krat. V nadalnjem delu smo pri donorskih sevih klebsiel in transkonjugantah preverili prisotnost nedavno opisane različice gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib-cr*, ki posreduje rezistenco proti kinolonom, ter prisotnost divjega alela *aac(6')-Ib*. Zapis za *aac(6')-Ib-cr* smo odkrili pri 32-odstotkih sevov, zapis za alel divjega tipa pri 43,7-odstotkih sevov, pri 13,6-odstotkih sevov pa smo odkrili oba alela. Pri vseh transkonjugantah je bil prisoten le alel *aac(6')-Ib-cr*. Povečanje števila sevov z zapisom za *aac(6')-Ib-cr* korelira s povečanjem števila proti kinolonom rezistentnih sevov in znižanjem števila sevov z intermediarnim fenotipom. Da bi ugotovili ali je porast rezistence posledica klonalnega razsoja enega ali nekaj sevov ali pa razširjanja plazmidov z determinantno rezistence, smo pregledali različnost plazmidov pri transkonjugantah. Na podlagi vzorca fragmentov po restrikciji s *PstI* smo ugotovili, da lahko plazmide razvrstimo v dve skupini. S PCR-RFLP smo preverili še prisotnost integrонov iz različnih razredov. Integrone razreda 1 smo odkrili pri 87,4-odstotkih sevov klebsiel z ESBL predstavnikov drugih dveh razredov pa nismo zasledili..

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dn  
DC 577.27:579.61:616.6(043.2)=863  
CX *Klebsiella* sp./quinolone resistance/*qnr*/ESBL/aminoglycoside acetyltransferase/  
*aac(6')-Ib-cr*  
AU KEBER, Rok  
AA GRABNAR, Miklavž (supervisor)/AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (co-advisor)/  
ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI QUINOLONE RESISTANCE, INTEGRONS AND KLEBICINS OF  
UROPATHOGENIC ESBL *Klebsiella* STRAINS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 89 p., 14 tab., 8 fig.,  
LA sl  
AL sl/en  
AB A total of 103 *Klebsiella* sp. strains from various sources, identified at the Institute of Public Health in Ljubljana between the years 2000 and 2005, have been screened by PCR for the presence of *qnrA*, *qnrS* and *qnrB* genes. None of the three tested genes was detected. Additionally quinolone resistance was transferred by conjugation. Twenty-seven transconjugants with up to 16-fold increased MICs of ciprofloxacin, in comparison to the recipient strain J53 Az<sup>r</sup> were obtained. Furthermore all *Klebsiella* sp. strains and their transconjugants have been screened for the presence of the recently described variant of the aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-Ib-cr*, which confers low-level plasmid-mediated quinolone resistance, and the wild type allele *aac(6')-Ib*. In forty-five (43,7 %) of the 103 donor strains we detected non-cr wild type allele, 33 (32 %) harboured the cr-variant and 14 (13,6 %) carried both variants. All analysed transconjugants carried just the *aac(6')-Ib-cr* variant. The increased prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene in the year 2003 coincides with the increased number of quinolone resistant ESBL *Klebsiella* sp. strains. In order to determine the diversity of plasmids containing *aac(6')-Ib-cr* gene, plasmid DNA from 27 transconjugants was isolated and digested with *PstI* restriction enzyme. Two main groups with different plasmid backbones were detected after RFLP analysis. All donor strains were also tested for the presence of different integron classes. Class 1 integrons were detected in 90 (87,4%) of 103 strains. No class 2 and class 3 integrons were detected.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 BAKTERIJSKI ROD <i>Klebsiella</i> .....	4
2.2 INFEKCIJE SEČIL .....	5
2.2.1 <i>Zdravljenje infekcij sečil</i> .....	6
2.3 ZDRAVLJENJE INFEKCIJ S PROTIMIKROBNIMI UČINKOVINAMI IN MEHANIZMI REZISTENCE PROTI NJIM.....	7
2.3.1 <i>Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin</i> .....	7
2.3.2 <i>Mehanizmi rezistence proti protimikrobnim učinkovinam</i> .....	8
2.4 β-LAKTAMI .....	9
2.4.1 <i>Delovanje β-laktamov</i> .....	9
2.4.2 <i>Mehanizmi rezistence proti β-laktamom</i> .....	9
2.5 ESBL IN PROBLEMATIKA SEVOV Z ESBL .....	12
2.5.1 <i>Značilnosti in izvor ESBL</i> .....	12
2.5.2 <i>Razdelitev ESBL v skupine</i> .....	12
2.5.3 <i>Geografska razširjenost in problematika ESBL</i> .....	15
2.5.4 <i>Zdravljenje infekcij s sevi z ESBL</i> .....	17
2.6 KINOLONI .....	18
2.6.1 <i>Delovanje kinolonov</i> .....	18
2.6.2 <i>Mehanizmi rezistence proti kinolonom</i> .....	19
2.7 SULFAMETOKSAZOL-TRIMETOPRIM .....	28
2.7.1 <i>Delovanje sulfametoksazol-trimetoprima</i> .....	28
2.7.2 <i>Mehanizmi rezistence proti sulfametoksazol-trimetoprimu</i> .....	28

2.8	INTEGRONI .....	29
2.9	BAKTERIOCINI PRI BAKTERIJAH <i>Klebsiella sp.</i> - KLEBICINI .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>33</b>
3.1	MATERIAL .....	33
3.1.1	<i>Bakterijski sevi</i> .....	33
3.1.2	<i>Gojišča</i> .....	34
3.1.3	<i>Kemikalije</i> .....	35
3.1.4	<i>Encimi</i> .....	37
3.1.5	<i>Pufri in reagenti</i> .....	37
3.1.6	<i>Oprema</i> .....	39
3.2	METODE .....	41
3.2.1	<i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</i> .....	41
3.2.2	<i>Agarozna gelska elektroforeza</i> .....	44
3.2.3	<i>Restrikcijska analiza PCR pomnožkov</i> .....	45
3.2.4	<i>Konjugacija klebsiel z ESBL</i> .....	46
3.2.5	<i>Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri izbranih sevih klebsiel z ESBL in njihovih primarnih transkonjugantah</i> .....	46
3.2.6	<i>Ugotavljanje odpornosti proti kanamicinu</i> .....	46
3.2.7	<i>Ugotavljanje prisotnosti gena qnr s hibridizacijo</i> .....	47
3.2.8	<i>Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant</i> .....	50
3.2.9	<i>Test za ugotavljanje klebicinov</i> .....	52
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>53</b>
4.1	ZBIRKA UROPATOGENIH SEVOV KLEBSIEL Z ESBL .....	53
4.2	ANALIZA UROPATOGENIH SEVOV KLEBSIEL Z ESBL .....	54
4.2.1	<i>Ugotavljanje prisotnosti genov qnr s PCR</i> .....	57
4.2.2	<i>Ugotavljanje prisotnosti determinante qnr s hibridizacijo</i> .....	57
4.2.3	<i>Konjugacija klebsiel z ESBL</i> .....	58
4.2.4	<i>Ugotavljanje prisotnosti alela aac(6')-Ib in aac(6')-Ib-cr, ki kodirata divjo in mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze, pri sevih klebsiel z ESBL</i> ..	60
4.2.5	<i>Ugotavljanje prisotnosti integronov posameznih razredov pri sevih klebsiel z ESBL</i> .....	63

<b>4.3 ANALIZA TRANSKONJUGANT</b> .....	<b>64</b>
4.3.1 <i>Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloxacin pri primarnih transkonjugantah, njihovih donorjih in recipientu.</i> .....	66
4.3.2 <i>Ugotavljanje prisotnosti divjega in mutiranega tipa aminoglikozid acetiltransferaznega gena pri primarnih transkonjugantah</i> .....	68
4.3.3 <i>Ugotavljanje odpornosti proti kanamicinu</i> .....	68
4.3.4 <i>Restriksijski profil plazmidov izoliranih iz transkonjugant</i> .....	68
4.3.5 <i>Tipizacija sevov klebsiel z ESBL na podlagi izločanja klebicinov</i> .....	70
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>72</b>
5.1 SKLEPI .....	79
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>81</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>82</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1.</b> $\beta$ -laktamaze pri po Gramu negativnih bakterijah .....	11
<b>Preglednica 2.</b> Generacije kinolonov s primeri, spekter njihovega delovanja in medicinska uporaba .....	18
<b>Preglednica 3.</b> Laboratorijski sevi <i>E. coli</i> , ki smo jih uporabljali pri delu.....	33
<b>Preglednica 4.</b> Založne in končne koncentracije antibiotikov v gojišču LB.....	34
<b>Preglednica 5.</b> Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR.....	42
<b>Preglednica 6.</b> Razporeditev uropatogenih sevov klebsiel z ESBL po letih, vir sevov in rezistenca proti Cip, Nor in Sxt.....	53
<b>Preglednica 7.</b> Število (%) proti Cip, Nor in Sxt rezistentnih, intermediarnih in občutljivih sevov v celotni zbirki.....	54
<b>Preglednica 8.</b> Rezultati analize sevov klebsiel z ESBL .....	55
<b>Preglednica 9.</b> Velikost fragmentov po restrikciji qac1/qac2 PCR pomnožkov z encimoma <i>TaaI</i> in <i>NdeI</i> v primeru <i>aac(6')-Ib</i> in <i>aac(6')-Ib-cr</i> različice gena za aminoglikozid acetiltransferazo .....	60
<b>Preglednica 10.</b> Prisotnost divjega tipa gena za aminoglikozid acetiltransferazo <i>aac(6')-Ib</i> in mutirane različice <i>aac(6')-Ib-cr</i> pri sevih klebsiel z ESBL po posameznih letih.....	62
<b>Preglednica 11.</b> Velikost fragmentov nastalih po restrikciji PCR pomnožkov dobljenih s parom degeneriranih začetnih oligonukleotidov hep35/hep36 in razrezanih z encimoma <i>RsaI</i> ali <i>HinfI</i> .....	63
<b>Preglednica 12.</b> Rezultati analize transkonjugant .....	65
<b>Preglednica 13.</b> Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za antibiotik ciprofloksacin....	66
<b>Preglednica 14.</b> Prisotnost klebicinov pri sevih klebsiel z ESBL .....	71

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1.</b> Svetovna razširjenost determinant QnrA, QnrB in QnrS.....	24
<b>Slika 2.</b> Genetsko okolje genov <i>qnr</i> .....	25
<b>Slika 3.</b> Primer elektroforeze PCR-produktov zapisa za opornost proti kinolonom <i>qnrA</i> .....	57
<b>Slika 4.</b> Ugotavljanje prisotnosti genov <i>qnr</i> pri zbirki klebsiel s hibridizacijo.....	58
<b>Slika 5.</b> Primer restrikcijske analize fragmentov pri nekaterih sevih klebsiel z ESBL, izoliranih v letu 2004, po restrikciji z encimom <i>TaaI</i> .....	61
<b>Slika 6.</b> Primer restrikcijske analize fragmentov pri nekaterih sevih klebsiel z ESBL izoliranih v letu 2004 po restrikciji z encimom <i>NdeI</i> .....	62
<b>Slika 7.</b> Primera difuzijske metode Etest, s katero smo ugotavljali MIK za ciprofloksacin..	67
<b>Slika 8.</b> Restrikcijski profil plazmidov transkonjugant po restrikciji z encimom <i>PstI</i> .....	69

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- Ap.....ampicilin  
Az.....natrijev azid  
BHI.....gojišče “brain heart infusion”  
bp.....bazni par  
Cip.....ciprofloksacin  
Cm.....kloramfenikol  
DNA.....deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)  
dNTP.....deoksiribonukleozid trifosfat  
EDTA....etilendiamintetraocetna kislina  
ESBL.....laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja (extended-spectrum  $\beta$ -lactamases)  
IVZ.....Inštitut za varovanje zdravja  
Kn.....kanamicin  
LB.....gojišče Luria-Bertani  
MIK.....minimalna inhibitorna koncentracija  
Nor.....norfloksacin  
PBP.....penicilin vezovi proteini (penicillin binding proteins)  
PCR.....verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)  
PMQR.....plazmidno posredovana rezistenca proti kinolonom (plasmid-mediated quinolone resistance)  
RNA.....ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)  
RNaza.....encim, ki cepi molekule RNA  
RFLP.....polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)  
SDS.....natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulphate)  
TBE.....Tris-boratni elektroforezni pufer  
Tc.....tetraciklin  
TE.....Tris-EDTA  
Tp.....trimetoprim  
UV.....ultravijolična (svetloba)

## 1 UVOD

Bakterije iz rodu *Klebsiella* so oportunistični patogeni, ki povzročajo bolezni kot so pljučnica, septikemija, infekcije sečil, infekcije mehkih tkiv pri poškodbah in meningitis pri novorojenčkih. Najpogosteje se z njimi okužijo ljudje z oslabljenim imunskim sistemom v bolnišničnem okolju. Klebsiele povzročajo kar 5 do 7-odstotkov vseh bolnišničnih infekcij, zato jih uvrščamo med 8 najpogostejših bolnišničnih patogenov.

Za zdravljenje infekcij, ki jih povzročajo klebsiele in druge enterobakterije se je v preteklosti najpogosteje uporabljalo aminoglikozidne in  $\beta$ -laktamske antibiotike. V 80. letih dvajsetega stoletja so se prvič pojavili sevi z zapisom za ESBL, ki so rezistentni proti večini  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, vključno s cefalosporini novejših generacij in monobaktami. Sevi z zapisom za ESBL so danes še posebno pri bakterijah iz rodu klebsiella zelo razširjeni, saj ponekod predstavljajo kar 45-odstotkov vseh klinično izoliranih sevov klebsiel.

ESBL so večinoma na velikih konjugativnih plazmidih, ki so zmožni hitrega horizontalnega prenosa med različnimi rodovi iz družine enterobakterij. Na teh plazmidih so poleg ESBL tudi geni za rezistenco proti številnim drugim protimikrobnim učinkovinam. Bakterije, ki imajo te plazmide, so zato rezistentne proti široki paleti protimikrobnih učinkovin, vključno s kinoloni, ki se v zadnjem času uporabljajo kot alternativa  $\beta$ -laktamom pri zdravljenju infekcij sečil. Delež kliničnih sevov enterobakterij z ESBL, ki so rezistentni tudi proti ciprofloxacinu je kar 34-odstotkov.

Kinoloni z razširjenim spektrom delovanja, kot sta norfloksacin in ciprofloxacin so pogosto uporabljene protimikrobne spojine, ki so zelo učinkovite proti po Gramu negativnim bakterijam. Dolgo časa sta bila znana le dva mehanizma rezistence proti kinolonom; rezistenca zaradi spremembe tarčnih mest kinolonov ali pa rezistenca zaradi zmanjšanega kopiranja antibiotika v celici. Oba mehanizma sta posledica mutacij kromosomskih genov. Leta 1998 so znanstveniki odkrili prvi plazmidno kodiran protein za nizko rezistenco proti kinolonom, imenovan Qnr. Kasneje so odkrili še različici QnrS in QnrB. Čeprav je gen *qnr* razširjen po vsem svetu, razen v Južni Ameriki pa prevalenca tega gena ni večja od 20-odstotkov. Gen *qnr* v Sloveniji še ni bil odkrit.

Januarja 2006 so raziskovalci odkrili novo determinanto rezistence proti kinolonom, kodirano na plazmidu. Gen *aac(6')-Ib* za aminoglikozid acetiltransferazo, ki z encimsko modifikacijo posreduje rezistenco proti aminoglikozidom je zaradi mutacije v le dveh baznih parih pridobil zmožnost inaktivacije nekaterih kinolonov, kot je naprimer ciprofloksacin, ki je med najbolj uporabljenimi antibiotiki v svetovnem merilu. Mutirana različica aminoglikozid acetiltransferaze imenovana *aac(6')-Ib-cr* (*cr*-ciprofloksacin resistant), je prvi do sedaj opisan primer gena, katerega produkt omogoča rezistenco proti protimikrobnima učinkovinama iz različnih skupin, od katerih je ena sintetična. Prevalenca tega gena v svetu še ni dobro poznana, vendar je po do sedaj znanih podatkih ta gen bolj pogost kot gen *qnr*.

Novo opisane plazmidno kodirane determinante za rezistenco proti kinolonom, skupaj s kromosomske kodiranimi mehanizmi, pripomorejo k vedno večjemu številu sevov, ki so odporni proti klinični koncentraciji kinolonov.

Plazmidno kodirani geni za rezistenco proti kinolonom in drugim protimikrobnim učinkovinam so največkrat na integronih, kar dodatno pripomore k horizontalnemu širjenju teh genov ter zmanjša učinkovitost zdravljenja s protimikrobnimi učinkovinami.

## 1.1 NAMEN DELA

Pri zbirki uropatogenih ESBL sevov klebsiel, ki so jih izolirali na Inštitutu za varovanje zdravja v leti 2000-2005 je z leti prišlo do povečanja števila proti ciprofloksacinu in norfloksacinu rezistentnih sevov in zmanjšanja števila sevov z intermediarnim fenotipom. V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali je to posledica plazmidno kodiranih mehanizmov za rezistenco proti kinolonom.

S PCR smo pri vseh sevih preverili prisotnost genov *qnrA*, *qnrS* in *qnrB*. Prisotnost gena *qnrA* ali morebitne spremenjene različice smo dodatno preverjali tudi z metodo hibridizacije.

S PCR smo ugotavljeni prisotnost genov za aminoglikozid acetiltransferazo. PCR pomnožke smo analizirali z restrikcijsko analizo in določili ali je PCR pomnožek del osnovne ali mutirane različice gena *aac(6')-Ib*, ki je odgovorna za rezistenco proti kinolonom. Prisotnost mutirane rezličice smo dodatno potrdili s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v PCR reakciji.

Determinanto za rezistenco proti kinolonom smo s konjugacijo prenesli iz donorskih sevov klebsiel z ESBL v recipientski sev *E. coli J53 Az<sup>r</sup>*. Transkonjugantam smo določili minimalne inhibitorne koncentracije in jih primerjali s podatki iz literature. Prisotnost genov za aminoglikozid acetiltransferazo smo posebej preverili še pri transkonjugantah.

Da bi ugotovili ali je povečanje števila proti kinolonom odpornih sevov posledica klonalnega razsoja sevov ali razširjanja plazmidov v populaciji bakterij, smo iz transkonjugant izolirali plazmide, jih razrezali z encimom *PstI* in glede na vzorec fragmentov ugotavljeni njihovo različnost. Različnost sevov klebsiel v zbirki smo skušali ugotoviti s pomočjo tipizacije s klebicini.

Ker so geni za rezistenco najpogosteje prisotni na integronih, smo prisotnost teh pri vseh 103 sevih preverili s PCR reakcijo, z uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov. PCR pomnožke smo analizirali z restrikcijsko analizo in jim določili integronski razred.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJSKI ROD *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* je identificiral nemški bakteriolog Edwin Klebs. Uvrščamo ga med  $\gamma$ -proteobakterije in v družino *Enterobacteriaceae*. Bakterije iz rodu *Klebsiella* so paličaste, negibljive in po Gramu negativne. Vsebujejo veliko kapsulo iz polisaharidov, ki daje kolonijam značilen sluzast videz in ima pomembno vlogo pri zaščiti pred gostiteljskim imunskim sistemom. Njihov metabolizem je fakultativno anaeroben, v odsotnosti kisika fermentirajo laktodo. Sevi iz rodu *Klebsiella* so v naravi zelo razširjeni. Pogosto so del normalne flore dihalnega in prebavnega trakta ljudi in živali (Greenwood in sod., 1998).

Sprva je bil rod *Klebsiella* na podlagi biokemijskih metod razdeljen na vrsti *K. oxytoca* in *K. pneumoniae*. Slednja je bila razdeljena na več podvrst. Danes pa je rod na podlagi podobnosti v zaporedju DNA razdeljen na 7 vrst; *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* in *K. ornithinolitica*. Pri infekcijah ljudi sta klinično najbolj pomembni oportunistično patogeni vrsti *K. pneumoniae* in *K. oxytoca* (Podschun in Ullman, 1998).

Na površini bakterij iz rodu *Klebsiella* sta prisotna dva tipa antigenov. Lipopolisaharidni (antigen O) in polisaharidni antigen kapsule (antigen K). Znanih je 77 antigenov K in 9 antigenov O. Na podlagi antigenov O in K lahko klebsiele razdelimo v različne serotype. Klebsiele lahko tipiziramo tudi na podlagi prisotnosti bakteriocinov-klebicinov, ki jih sevi izločajo kot obrambo pred drugimi sevi iz istega rodu (Campbell in sod., 1996).

Bakterije iz rodu *Klebsiella* najpogosteje povzročajo infekcije pljuč pri alkoholikih, diabetikih, ljudeh s kronično bolezni jo pljuč in starejših ljudeh. *K. pneumoniae* povzroča pljučnico, ki je zaradi pogostih gnojnih abscesov in nekroze delov pljuč smrtna v kar 50-odstotkih primerov. V zadnjem času so bakterije iz rodu *Klebsiella* vedno pogostejši povzročitelji infekcij v bolnišnicah, kjer povzročajo infekcije sečil, respiratornega trakta ter ran po operacijah. Povzročajo še bakteriemijo in meningitis, enterotoksigeni sevi pa še diarejo. Sevi iz rodu *Klebsiella* so vzrok za kar 3 do 7-odstotkov vseh bolnišničnih infekcij, kar jih uvršča med osem najbolj problematičnih bakterij. Količina bakterij iz rodu *Klebsiella* pri hospitaliziranih bolnikih je trikrat večja kot sicer in narašča s časom, ki ga bolniki

preživijo v bolnišnici. Rezervoarji za infekcije v bolnišnicah so gastrointestinalni trakt bolnikov, roke bolnišničnega osebja ter nesterilna bolnišnična oprema.

V zadnjem času vedno pogosteje prihaja do izbruha bolnišničnih infekcij s sevi iz rodu *Klebsiella*, ki so rezistentni proti široki paleti protimikrobnih učinkovin. Vzrok temu je pogosta uporaba protimikrobnih učinkovin pri hospitaliziranih bolnikih, ki je povzročila razvoj multirezistentnih sevov. Ti sevi so zelo virulentni, se hitro širijo in vsebujejo zapis za  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL – ang.: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase), ki so najpogosteje prisotne prav pri sevih iz rodu *Klebsiella* (Carpenter, 1990 in Coovadia in sod., 1992).

## 2.2 INFEKCIJE SEČIL

Infekcije sečil so najpogostejši vzrok bolnišničnih in izvenbolnišničnih infekcij v razvitih državah. Samo v Združenih Državah Amerike zaradi simptomov infekcije sečil zdravnika letno obišče več kot 9,6 milijonov ljudi. Infekcije sečil se lahko pojavijo v akutni ali kronični oblikih ter so glede na mesto prisotnosti različno nevarne. Kar 40-odstotkov žensk se vsaj enkrat v življenju sreča z akutno infekcijo sečil. Pri polovici od teh so infekcije ponavljalajoče. Prizadete so predvsem spolno aktivne ženske, starejši ljudje ter bolniki s katetrskimi vstavki. Bolniki s funkcionalno ali anatomska nepravilnostjo sečil, diabetiki ter nosečnice pa so podvrženi večjemu tveganju za razvoj zapletene oblike infekcije (Stamm in Norrby, 2001).

Povzročitelji infekcij sečil so različni, odvisno od prizadetega mesta infekcije, spola, starosti in zdravstvenega stanja pacienta. Vzrok za 90-odstotkov akutnih infekcij je *E. coli*, 10 do 20-odstotkov infekcij sečil povzroči koagulaza negativni *Staphylococcus saprophyticus*, 6 do 15-odstotkov jih povzročijo bakterije iz rodu *Klebsiella*, ostalo pa enterobakterije, kot so *Enterobacter*, *Salmonella* in *Shigella*. *K. pneumoniae* je kot povzročiteljica akutnega nezapletenega cistitisa pri ženskah uvrščena na četrto mesto, za *E. coli*, *S. saprophyticus* in *P. mirabilis*. Pri zapletenih infekcijah sečil, ki so največkrat posledica vstavljenega katetra, pa je *K. pneumoniae* uvrščena na drugo mesto, takoj za *E. coli* (Stamm, 1993).

## 2.2.1 Zdravljenje infekcij sečil

Vzrok za infekcije sečil so v večini primerov bakterije, zato jih lahko zdravimo z različnimi protimikrobnimi učinkovinami. Protimikrobne učinkovine delimo na antibiotike in druge sintetične spojine. Delujejo baktericidno (uničijo bakterije) ali bakteriostatično (zavrejo razmnoževanje bakterij). Mehanizem delovanja je preprečevanje sinteze celične stene bakterij, zaviranje sinteze beljakovin in nukleinskih kislin, ali pa vplivajo na procese povezane s citoplazemske membrano.

Za zdravljenje infekcij sečil se najpogosteje uporablja kombinacija zdravila sulfametoksazol-trimetoprim, ter kinoloni in  $\beta$ -laktami. V Sloveniji se pri zdravljenju okužb v zdravstvenih domovih v 57-odstotkih primerov predpiše zdravilo sulfametoksazol-trimetoprim, v 37-odstotkih fluorokinolone, v ostalih primerih pa  $\beta$ -laktame kot so cefalosporini ali semisintetični penicilini (Car in sod., 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 infekcije 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, zaradi katerega nastane več mikrookolij z različnimi fiziološkimi in kemičnimi gradienti, vključno z gradientom koncentracije protimikrobne učinkovine. Bakterije v biofilmu, ki so najbolj zaščitene, preživijo protimikrobovo terapijo ter nato tvorijo nov biofilm, ki je rezervoar nove infekcije. Včasih je zdravljenje s protimikrobnimi učinkovinami uspešno šele, ko je katetrski vstavek odstranjen (Spoering in Lewis, 2001).

## 2.3 ZDRAVLJENJE INFEKCIJ S PROTIMIKROBNIMI UČINKOVINAMI IN MEHANIZMI REZISTENCE PROTI NJIM

### 2.3.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin

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

- **Sinteza celične stene**

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

- **Celična membrana**

Baktericidni celični polipeptidi, kot so polimiksini, delujejo podobno kot kationski detergenti in razgrajujejo fosfolipidni dvosloj.

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

Makrolidi (eritromicin), linkozamidi (klindamicin) in kloramfenikol zaradi vezave na ribosomsko DNA preprečijo tvorbo peptidne vezi.

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

Tetraciklini preprečijo vezavo aminoacil-tRNA na A mesto na ribosomske podenote in onemogočijo iniciacijo translacije. Aminoglikozidi (streptomicin, gentamicin, kanamicin, tobramicin) zaradi vezave na 30S ribosomske podenote preprečijo pravilno translacijo proteina. Nastali peptid se razgradi.

- **Sinteza nukleinskih kislin**

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

- **DNA giraza**

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

### 2.3.2 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 naprimer mikoplazme, nimajo celične stene in so zato rezistentne proti penicilinom.
- **Neprepustnost bakterijske membrane za protimikrobno učinkovino**  
Večina po Gramu negativnih bakterij je nepropustna 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**

Rezistenca je lahko posledica mutacij v vzdrževalnih genih ali pa je zapisana v enemu ali več genih, ki jih posamezna vrsta za preživetje v neselekcijskih pogojih ne potrebuje. Če je rezistenca posledica mutacij genov na kromosому se ta prenaša večinoma le vertikalno iz generacije v generacijo. Opisani pa so nekateri primeri prenosa delov kromosoma s transformacijo in rekombinacijo prenešenega dela s spremenjenim genom v novemu gostitelju. V kolikor gre za samostojni genski zapis pa se ta lahko prenaša horizontalno z mobilnimi genetskimi elementi kot so: plazmidi, transpozoni, bakteriofagi in integroni. 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 (Brock..., 2003).

## 2.4 β-LAKTAMI

### 2.4.1 Delovanje β-laktamov

β-laktami so zelo pomembna skupina antibiotikov, ki vključuje peniciline, cefalosporine monobaktame, karbapeneme in cefamicine. Njihova skupna lastnost je prisotnost osnovnega β-laktamskega obroča. Od odkritja penicilina, prvega β-laktamskega antibiotika, so se zvrstili številni polsintetični β-laktamski antibiotiki, ki so bili rezistentni proti delovanju prvih opisanih bakterijskih β-laktamaz. β-laktami so inhibitorji sinteze celične stene. Vežejo se na encime transpeptidaze, ki katalizirajo navzkrižno povezavo stranskih skupin linearne peptidoglikanske verige. Ker linearne verige peptidoglikana v nastajajoči celični steni zaradi tega niso navzkrižno povezane je ta zelo šibka. Transpeptidaze vežejo peniciline in druge β-laktame, zato se imenujejo tudi penicilin vezovi proteini (PBP – ang.: Penicillin Binding Proteins). Kompleksi β-laktam-PBP povzročijo tudi sproščanje avtolizinov, ki razgradijo nedokončano celično steno. Zaradi zunanjega osmotskega pritiska bakterijska celica s tako oslabljeno celično steno propade (Brock..., 2003).

### 2.4.2 Mehanizmi rezistence proti β-laktamom

Bakterije so za obrambo pred β-laktami razvile več mehanizmov. Najpogosteji je sinteza plazmidno ali kromosomalno kodiranih β-laktamaz. Poleg tega so možne še mutacijske spremembe tarčnih PBP, pridobitev novih, proti β-laktamom neobčutljivih PBP, aktivno izčrpavanje iz mesta delovanja in spremembe proteinov zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij (Murray in sod., 1999).

β-laktamaze so najštevilčnejši in najbolj razširjeni bakterijski encimi za inaktivacijo antibiotikov pri enterobakterijah. Čeprav so bili sprva odkriti pri po Gramu pozitivnih vrstah (stafilokokne penicilinaze), so glavni mehanizem obrambe predvsem pri po Gramu negativnih bakterijah, pri katerih se izločajo v periplazemski prostor (Jacoby in Muñoz-Price, 2005).

Evolucijsko ločimo dve glavni 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 razvile iz PBP v zadnjih dveh milijardah let (Medeiros, 1997). S pomočjo serina v aktivnem mestu cepijo amidno vez v β-laktamskem obroču. Posledica je inaktivacija β-laktamov, ki zato niso več sposobni vezave na PBP in ne morejo inhibirati

sinteze celične stene bakterij. Druga skupina  $\beta$ -laktamaz so metaloencimi, ki imajo kot kofaktor kovinski ion, večinoma cink (Livermore, 1995).

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa je poglavitni mehanizem rezistenca zaradi spremembe PBP. Lep primer je proti meticilinu rezistentna bakterija *Staphylococcus aureus* (MRSA – ang.: methicillin-resistant *S. aureus*), ki je rezistentna proti vsem  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Razlog za rezistenco je genetski zapis za številne PBP, rezistentne proti  $\beta$ -laktamom, ki prevzamejo vlogo normalnih PBP ob izpostavitvi  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Izvor teh genov pri *S. aureus* je neznan (Murray in sod., 1999).

Z začetkom uporabe  $\beta$ -laktamskih antibiotikov v medicini in veterini so se pojavile tudi nove  $\beta$ -laktamaze. Sprva pri klinično pomembnih sevih kot so *E. coli* in *K. pneumoniae*. Ti encimi so poleg naravnih  $\beta$ -laktamov hidrolizirali tudi ampicilin in nekatere cefalosporine prve generacije, zato so jih poimenovali  $\beta$ -laktamaze s širokim spektrom delovanja (BSBL – ang.: broad-spectrum  $\beta$ -lactamase) (Livermore, 1995).  $\beta$ -laktamaze širokega spektra so se kmalu razširile tudi na bakterije, ki prej  $\beta$ -laktamaz niso proizvajale, kot so *Haemophilus sp.* in *Neisseia gonorrhoeae*. V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je v klinično uporabo prišla tretja generacija cefalosporinov kot so ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson, ceftrizoksim in monobaktami. Zaradi posebne strukture teh antibiotikov jih  $\beta$ -laktamaze širokega spektra niso več razgrajevale. Posledično so se kmalu pojavile nove različice  $\beta$ -laktamaz, sposobne razgraditi cel spekter na novo uporabljenih  $\beta$ -laktamskih antibiotikov. Imenovali so jih  $\beta$ -laktamaze razširjenega spektra (ESBL - ang.: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) (Livermore 1995 in Bush s sod., 1995).

Ambler s sod. (1992) je številne do sedaj opisane  $\beta$ -laktamaze razdelil v štiri molekulske razrede (A, B, C in D) glede na molekulsko težo in aminokisline, ki so prisotne v aktivnem mestu encima. V razred A je uvrstil penicilinaze, cefalosporinaze in  $\beta$ -laktamaze s širokim spektrom delovanja, ki jih inhibirajo  $\beta$ -laktamski inhibitorji kot so klavulanska kislina, sulbaktam in tazobaktam. Encimi razreda B razgrajujejo vse  $\beta$ -laktame in niso občutljivi za klavulansko kislino. Večina  $\beta$ -laktamaz razreda A in B je kodiranih na plazmidu. Med  $\beta$ -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).

**Preglednica 1.**  $\beta$ -laktamaze pri po Gramu negativnih bakterijah (prirejeno po Bush in sod., 1995 in Ambler in sod., 1992)

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

<sup>1</sup> BES-GES skupina, PER skupina, SFO-VEB skupina, TLA-1

<sup>2</sup> 1,2,3,4 GC cefalosporini prve, druge, tretje in četrte generacije

Znanih je več različnih tipov encimov iz različnih razredov. TEM-1 je bila prva opisana  $\beta$ -laktamaza. Odkrili so jo v šestdesetih letih prejšnjega stoletja na plazmidu pri enem samem sevu *E. coli*. Zaradi horizontalnega širjenja je TEM-1 danes najbolj pogosta  $\beta$ -laktamaza, predvsem pri enterobakterijah. Razgrajuje ampicilin, penicilin in cefalosporine prve generacije (Livermore, 1995). SHV-1 je  $\beta$ -laktamaza, ki je bila pri bakteriji *K. pneumoniae* sprva največkrat prisotna na kromosomu, v zadnjem času pa so jo našli tudi na plazmidu (Bradford, 2001).

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

## 2.5 ESBL IN PROBLEMATIKA SEVOV Z ESBL

### 2.5.1 Značilnosti in izvor ESBL

ESBL so encimi, ki cepijo amidno vez v  $\beta$ -laktamskem obroču pri penicilinih, monobaktamih, vseh cefalosporinih tretje in nekaterih cefalosporinih četrte generacije (cefepim, cefpirom). Ne morejo pa razgraditi cefamicinov kot so cefoksitin in cefotetan. Po Amblerju sodijo v molekulski razred A in D. Klavulanska kislina, močno zavira delovanje encimov iz razreda A, manj pa deluje na encime iz razreda D (Bush in sod., 1995).

Leta 1983 so Knothe in sodelavci poročali o različici  $\beta$ -laktamaze s širokim spektrom delovanja SHV-1, ki je imela v aktivnem centru encima na mestu 238 serin zamenjan z aminokislino glicinom. Razlika v eni aminokislini je omogočila tej različici aktivnost proti cefalosporinom tretje generacije. To je bila prva opisana različica ESBL, poimenovana SHV-2 (Amábile-Cuevas, 2007). Večina ESBL izvira iz TEM in SHV skupin encimov, v zadnjem času pa so odkrili še nove, TEM in SHV nesorodne skupine encimov, kot so CTX-M in OXA (Bonnet, 2004).

ESBL najpogosteje najdemo pri *K. pneumoniae* in *E. coli*, poleg tega pa še pri drugih rodovih enterobakterij, nefermentativnih po Gramu negativnih bacilih, *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Capnocytophaga sp.* in podobnih. Geni, ki kodirajo ESBL, so najpogosteje na velikih plazmidih, zaradi možnosti transpozicije pa jih najdemo tudi na kromosomu. Nekateri zapisi, naprimer tisti za skupino CTX-M, so pogosto prisotni v integronih (Petroni in sod., 2002, in Bradford, 2001). Sevi z ESBL so poleg  $\beta$ -laktamov zelo pogosto rezistentni še proti drugim protimikrobnim učinkovinam, tudi kinolonom. Gen za *qnr* je na plazmidu najpogosteje prisoten z ESBL iz skupin CTX-M, FOX, TEM in drugimi  $\beta$ -laktamazami, gen *aac (6')-lb-cr* pa z  $\beta$ -laktamazo OXA-1 (Petroni in sod., 2002 in Ambrožič J., neobjavljen).

### 2.5.2 Razdelitev ESBL v skupine

#### 2.5.2.1 ESBL skupine TEM

Poznamo dve različni družini ESBL tipa TEM, ki sta nastali z zamenjavo ene same aminokisline izvornih  $\beta$ -laktamaz TEM-1 ali TEM-2. Ta skupina danes obsega 160 različnih encimov ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)) in je zelo pogosta, saj novi encimi zlahka nastajajo s

točkovnimi mutacijami v genskih zapisih. Medtem ko so TEM-10 in TEM-26 med najbolj razširjenimi TEM-ESBL encimi v ZDA in večini evropskih držav, so bili le redkokdaj najdeni pri izolatih iz Južne Amerike, kjer je sicer problematika sevov z ESBL največja (Jacoby in Muñoz-Price, 2005). Večina ESBL iz skupine TEM je bolj učinkovitih proti ceftazidimu kot cefotaksimu ali ceftriaksonu. Ceftazidim se je do leta 1998 po navodilih inštituta za klinične standarde (CLSI - Clinical Laboratory Standard Institute) uporabljal kot edini substrat za detekcijo ESBL v združenih državah. To je verjetno razlog za domnevno največjo razširjenost skupine TEM, saj sevi s cefotaksimazo (skupina CTX) na ta način niso bili zaznani (Paterson in Bonomo, 2005).

#### 2.5.2.2 ESBL skupine SHV

Kot že omenjeno so encimi iz skupine SHV prve odkrite ESBL. Nastali so iz izvornega encima SHV-1 s spremembo ene ali dveh aminokislin. Do danes je opisanih več kot sto različic te skupine ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). SHV-5 in SHV-12 sta prisotna predvsem v Združenih državah, SHV-2 in SHV-5 pa prevladujeta v Evropi in Latinski Ameriki (Jacoby in Muñoz-Price, 2005).

#### 2.5.2.3 ESBL skupine CTX-M

V poznih osemdesetih letih prejšnjega stoletja so poročali o novih skupinah ESBL, ki so bile s skupinama TEM in SHV nesorodne. Prvi primer je bil encim FEC-1, najden pri proti cefotaximu rezistentni *E. coli*, ki so jo izolirali iz iztrebka laboratorijske živali in mu niso posvečali velike pozornosti (Bonnet, 2004).

Leta 1990 so Bauernfeind in sodelavci (1992) pri *E. coli* odkrili encim, ki je razgrajeval cefotaxim, ne pa ceftazidima, zato so ga poimenovali CTX-M-1. To je bil prvi encim v družini cefotaximaz (CTX-M), ki danes obsega že 67 različic. Encimi iz ESBL družine CTX-M se z encimi iz skupin TEM ali SHV ujemajo v največ 40-odstotkih aminokislin. ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). Sevi s CTX-M so bolj občutljivi na tazobaktam kot na sulbaktam ali klavulansko kislino (Paterson in sod., 2003).

V letih 1990-1992 so iz Argentine poročali o številnih primerih sepse povzročene z bakterijo *Salmonella enterica var. Typhimurium*. Izoliran sev je bil toleranten proti visoki koncentraciji

cefotaxima ( $MIC > 64 \text{ mg/L}$ ), vendar občutljiv za ceftazidim. V laboratoriju A. Bauernfeinda so pri omenjenem sevu potrdili novo različico cefotaksimaze imenovano CTX-M-2 (Bauernfeind, 1992). Plazmid z genom za CTX-M-2 se je kasneje horizontalno razširil tudi v netifoidne predstavnike rodov *Salmonella* in *Klebsiella* (Casellas, 1999 in Bonnet 2004). V letu 2005 so v Argentini gen CTX-M-2 našli že pri kar 40-odstotkih proti cefalosporinom rezistentnih sevov *K. pneumoniae*, 25-odstotkih *E. coli*, 20-odstotkih *P. mirabilis* in mnogih drugih sevih enterobakterij, vključno s tistimi s prisotnim encimom AmpC. Večina sevov ESBL iz rodu *Salmonella* in *Shigella* vsebuje prav gen CTX-M-2 (Rodriguez in sod., 2005).

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 cefotaxim. Prisotnost CTX-M je bilo tako lažje zaznati, čemur so sledila številna poročila o njegovi pojavnosti, širom po svetu (Paterson in Bonomo 2005).

Encimi CTX-M izhajajo iz kromosomalnih genov bakterij iz rodu *Kluyvera*, ki so se prenesli na plazmide drugih enterobakterij.  $\beta$ -laktamaze rodu *Kluyvera* sodijo v skupino KLU. Ugotovili so, da je kromosomalno kodirana KLUA ( $\beta$ -laktamaza pri *K. ascorbata*) verjetno izvorna  $\beta$ -laktamaza, iz katere je nastal CTX-M-1, prvi encim iz te skupine. Podobnost v aminokislinskih sekvenkah med KLUG-1 (*K. georgiana*) in CTX-M-8 je kar 99-odstotna (Bonnet 2004 in Paterson in Bonomo 2005).

Geni za 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 PMQR. Uporaba vseh naštetih protimikrobnih učinkovin pospešuje razširjanje enterobakterijskih sevov s CTX-M (Paterson in Bonomo, 2005).

#### 2.5.2.4 ESBL skupine PER

Encimi PER se z encimi iz skupin TEM, SHV in CTX-M ujemajo le v 25 do 27-odstotkih aminokislin. Razgrajujejo peniciline in cefalosporine in so občutljivi za klavulansko kislino.

Učinkovitost razgradnje cefotaxima, ceftriaxona in ceftazidima je enaka. Poznamo le tri različice PER encimov ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). PER-1 je bil odkrit v Turčiji, kjer je zelo razširjen, saj je prisoten kar pri 11-odstotkih sevov *Pseudomonas aeruginosa* (Vahaboglu in sod., 1998). PER-1 se je razširil tudi v države oddaljene od Turčije, kot je Francija, Italija, Belgija in Koreja. PER-2, ki se s PER-1 ujema v 86-odstotkih aminokislin pa je razširjen predvsem v južnem delu latinske Amerike (Paterson in Bonomo, 2005).

#### 2.5.2.5 ESBL skupine OXA

ESBL encime iz skupine OXA po Amblerju uvrščamo v razred D, za katerega je značilna le šibka inhibicija s klavulansko kislino. Še pred kratkim so OXA-ESBL veljale za manj pogoste, danes pa ta skupina obsega že 105 različnih encimov ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). Razgrajujejo predvsem oksacilin, ceftazidim, nekateri pa še cefotaksim in cefepim. Medtem ko so druge skupine ESBL najpogosteje prisotne pri *K. pneumoniae* in *E. coli*, je bila skupina OXA do sedaj najpogosteje opisana pri bakterijah vrste *P. aeruginosa*, izoliranih v Turčiji in Franciji. Ker so OXA-ESBL sprva razvrščali v to skupino na podlagi fenotipa, se encimi v tej skupini precej razlikujejo po aminokislinski sestavi, saj so si podobni v največ 20-odstotkih (Jacoby in Muñoz-price, 2005). Zanimivo je, da se OXA-1 pri klebsielah z ESBL izoliranih v Sloveniji skoraj vedno pojavlja na plazmidu, ki vsebuje zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze (Ambrožič J., neobjavljen).

#### 2.5.2.6 ESBL drugih skupin

V zadnjih letih se predvsem iz Azije pojavljajo poročila o vedno novih encimih ESBL, ki pa zaenkrat še niso zelo pogosti. Spadajo v skupine VEB, GES, BES, TLA, SFO, IBC, SME, KPC, VIM in IMP (Paterson in Bonomo, 2005, in [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)).

### 2.5.3 Geografska razširjenost in problematika ESBL

Prvi obsežnejši podatki o klinični razširjenosti sevov z ESBL so prišli iz Francije. Brun-Buisson in sodelavci (1987) so v poznih 80. letih prejšnjega stoletja poročali o izbruhu infekcij s sevi z ESBL v številnih bolnišnicah in mestih v Franciji. Druge države v tistem času še niso izvajale obsežnih testov za ugotavljanje prisotnosti ESBL, kar je verjetno tudi razlog za manjšo pojavnost sevov z ESBL v primerjavi s Francijo.

Prevalenca sevov z ESBL se razlikuje med kontinenti, državami in celo posameznimi bolnišnicami. Pogosteješi so v državah z nižjim standardom kot v razvitih državah. To nam lepo kaže podatek, da v Nemčiji sevi z ESBL predstavlajo 2,6-odstotka, na Nizozemskem 2-odstotka, v Grčiji, Turčiji in na Portugalskem pa več kot 25-odstotkov vseh klinično izoliranih sevov. V Turčiji so v klinični zbirki sevov *K. pneumoniae* ugotovili, da jih kar 58-odstotkov vsebuje zapis za ESBL (Paterson in Bonomo 2005).

O največji prevalenci sevov z ESBL poročajo iz Latinske Amerike, kjer kar tretjina vseh klinično izoliranih sevov ima zapis za ESBL. Vzroki so številni; poleg slabih ekonomskih in socialnih razmer še slaba prehrana, nenadzorovana uporaba protimikrobnih učinkovin in slabe razmere v bolnišnicah. Slednji razlog je še posebno pomemben, saj slaba higiena pripomore k lažjemu horizontalnemu prenosu plazmidov z zapisom za ESBL, predvsem pri *K. pneumoniae*. Pri tej bakteriji so zapis za ESBL našli kar v 30 do 60-odstotkih vseh primerov (Bonnet, 2004).

Poleg Latinske Amerike je velik porast števila infekcij s sevi ESBL, kot tudi pojav novih encimov, zaznati predvsem v Aziji, še posebno na Kitajskem. Zadnji podatki kažejo, da kar 25 do 38-odstotkov *K. pneumoniae* izoliranih na Kitajskem vsebuje zapis za ESBL. Dejansko razširjenost sevov z ESBL v Aziji je težko določiti, saj manjkajo podatki iz manj razvitih in gosto naseljenih držav, kjer je raba protimikrobnih učinkovin največkrat nenadzorovana in nepremisljena. Na Japonskem, Kitajskem v Indiji in Koreji se zaradi povečane uporabe zdravila ceftriaxona še posebno hitro širi ESBL družina CTX-M (Wang in sod., 2003b, in Chang in sod., 2001).

Čeprav so sevi z ESBL po svetu zelo razširjeni je ponekod odstotek teh sevov še vedno zelo nizek. Take države so Avstralija in Nova Zelandija. V Avstraliji ima zapis za ESBL manj kot 5-odstotkov klinično izoliranih sevov enterobakterij, vendar kot drugod po svetu odstotek teh sevov hitro narašča. Zelo obsežna novozelandska študija je pokazala, da je od leta 2000 do leta 2006 odstotek sevov *K. pneumoniae* z ESBL narasel z nič na 4,2-odstotka. Pri *E. coli* pa iz 0,1 na 0,7-odstotka (Paterson in Bonomo, 2005 in Hefernan in Wodhouse, 2006).

## 2.5.4 Zdravljenje infekcij s sevi z ESBL

Glavni pogoj za uspešno zdravljenje bakterijskih infekcij je izbira ustrezne protimikrobine učinkovine. Če infekcijo s sevom z ESBL zdravimo s cefalosporini tretje in četrte generacije je zdravljenje neuspešno, posledica pa je večja smrtnost bolnikov. Rutinsko spremljanje prisotnosti ESBL v svetovnem merilu je za učinkovitejše zdravljenje in kontrolo izbruhanih infekcij s temi sevi nujno. Pregledovanje kliničnih izolatov sevov *Klebsiella sp.*, *E. coli* in *P. mirabilis* na prisotnost ESBL se rutinsko ne izvaja v mnogih državah po svetu. Celo v Evropi in ZDA se izvaja le v polovici kliničnih laboratorijskih testov. Prisotnost ESBL se preverja po principu Jarlierjevega testa, kjer se opazuje rast bakterij na gojišču ob prisotnosti diska z ustreznim  $\beta$ -laktamom (cefotaximom, ceftriaxonom, ceftazidimom, cefepimom in aztreonamom), ob prisotnosti klavulanske kislina. 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 laboratorijskih testov posebej v revnih državah ne more privoščiti (Jarlier s sod., 1998 in Helfand in Bonomo 2005).

Najbolj učinkovito zdravilo proti večini infekcij s sevi z ESBL so 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  $\beta$ -laktamskega antibiotika in klavulanske kislina, ki zavira delovanje nekaterih  $\beta$ -laktamaz (Bret in sod., 1996).

Zdravljenje infekcij s sevi z ESBL je težavno, saj so geni za ESBL še posebno pri *K. pneumoniae* največkrat prisotni na velikih konjugativnih plazmidih skupaj z geni za rezistenco proti drugim, pogosto uporabljenim protimikrobnim učinkovinam, kot so aminoglikozidi, sulfonamidi, kloramfenikol, tetraciklin, trimetoprim in podobno. V zadnjem času je mnogo več sevov z ESBL rezistentnih tudi proti kinolonom, ki so se pogosto uporabljali kot alternativna terapija  $\beta$ -laktamom. Znanstveniki to povezujejo z razširjanjem plazmidno posredovane rezistence proti kinolonom (PMQR – ang.: plasmid-mediated quinolone resistance). Rezistenca proti kinolonom se pojavlja predvsem v povezavi z ESBL tipa CTX-M. Še bolj zaskrbljujoče pa je dejstvo, da *K. pneumoniae*, pri katerih so ESBL najpogosteje prisotne, lahko vsebuje zelo različne plazmide z rezistenčnimi geni, ki se pogosto prenašajo na druge enterobakterije (Sherley in sod., 2003).

## 2.6 KINOLONI

### 2.6.1 Delovanje kinolonov

Kinoloni so bakteriostatične učinkovine s širokim spektrom delovanja, ki se pogosto uporablajo v klinični in veterinarski medicini. Leta 1962 je bil odkrit prvi kinolon (nalidiksična kislina), ki je bil učinkovit le proti po Gramu negativnim bakterijam. Nalidiksična kislina in njeni prvi analogi so se uporabljali zgolj za zdravljenje infekcij sečil. Z modifikacijo osnovne strukture so se sčasoma pojavile nove generacije kinolonov, ki so učinkovite tudi proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Zaradi širokega spektra aktivnosti kinolone prištevamo med najbolj uporabljene protimikrobne učinkovine v svetovnem merilu (Acar in Goldstein, 1997 ).

**Preglednica 2.** Generacije kinolonov s primeri, spekter njihovega delovanja in medicinska uporaba (prirejeno po: Owens in Ambrose, 2000)

generacije kinolonov, primeri	antimikrobnna aktivnost	uporaba
<b>PRVA GENERACIJA:</b> nalidiksična kislina, cinoksacin	enterobakterije	zdravljenje preprostih infekcij sečil
<b>DRUGA GENERACIJA:</b> <u>razred I:</u> lomefloksacin, norfloksacin, enoksacin	enterobakterije	zdravljenje preprostih infekcij sečil
<u>razred II:</u> ofloksacin, ciprofloksacin	enterobakterije in atipični patogeni kot je <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (le ciprofloksacin)	zdravljenje zapletenih infekcij sečil, infekcij zaradi katetrskih vstavkov, gastroenteritis, bolnišnične infekcije, nekatere spolno prenosljive bolezni
<b>TRETJA GENERACIJA:</b> levofloksacin, sparfloksacin, gatifloksacin, moksifloksacin	enterobakterije, atipični patogeni, streptokoki	zdravljenje vseh zgoraj naštetih infekcij ter pljučnice.
<b>ČETRTA GENERACIJA:</b> trovafloksacin	enterobakterije, <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , atipični patogeni, streptokoki, na meticilin občutljivi sevi <i>S. aureus</i> , anaerobi	zdravljenje intraabdominalnih infekcij

Tarča kinolonov so bakterijske topoizomeraze. To so encimi, ki uravnavajo superzvijanje 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 supernavajoče 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 replikacija je tako onemogočena, kompleks se sprosti, ostane pa prekinjena veriga DNA. Podvojitev 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, in Snyder in Champness, 2003).

Pri po Gramu negativnih bakterijah je tarča kinolonov DNA-giraza, pri po Gramu pozitivnih pa topoizomeraza IV. Kinoloni novejših generacij (clinafloksacin, moksifloksacin) pa so zasnovani tako, da delujejo podobno proti obema encimoma (Hooper, 2000).

## 2.6.2 Mehanizmi rezistence proti kinolonom

Prevladujoča, do sedaj poznana mehanizma rezistence proti kinolonom sta; (i) sprememba tarčnih encimov zaradi mutacije, ter (ii) zmanjšana koncentracija kinolona v celici zaradi neprepustnosti membrane ali povečanega izražanje membranskih črpalk, ki črpajo kinolone iz celice. V obeh primerih je osnova rezistence mutacija kromosomskih genov. Nedavno pa je bila opisana tudi plazmidno kodirana rezistence proti kinolonom - PMQR. Raziskovalci so

mnenja, da kljub temu da ti elementi posredujejo le nizko stopnjo rezistence proti kinolonom, skupaj z mutacijami v kromosomskih genih omogočajo selekcijo visoko rezistentnih sevov in zaskrbljujoč porast v številu rezistentnih sevov pri kliničnih izolatih (Jacoby, 2005).

#### 2.6.2.1 Rezistenca zaradi spremembe tarčnega mesta

Glavna tarča kinolonov sta encimska kompleksa, ki sodelujeta pri zvijanju molekule DNA. To sta 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 (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 pojavi 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).

Tako je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za kinolone 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 MIK ob zamenjavi (Vila in sod., 1999).

### 2.6.2.2 Rezistenca z zmanjšanim vnosom ali izčrpavanjem kinolonov

Manjša količina kinolonov v celici je lahko posledica zmanjšane prepustnosti bakterijske membrane za kinolone ali pa večjega izražanja membranskih črpalk, ki črpajo kinolone iz celice. Kinoloni 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 uravnavane 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. Mehanizem rezistence pri drugih enterobakterijah je podoben kot pri *E. coli* (Jacoby, 2005 in Wang in sod., 2001).

### 2.6.2.3 Plazmidno kodirana rezistenca proti kinolonom - PMQR

Dolgo časa je veljalo, da so mutacije v kromosomskih genih edini mehanizem rezistence proti kinolonom. Ker so kinoloni sintetične spojine, so bili raziskovalci mnenja, da je evolucija mobilne genske determinante za rezistenco proti kinolonom v naravi malo verjetna. Raziskave so pokazale, da štirinajst let po začetku klinične uporabe kinolonov v medicini mobilna rezistenca pri patogenih sevih enterobakterij še ni bila prisotna (Robicsek in sod., 2006b, cit. po Burgman, 1977).

#### 2.6.2.3.1 PMQR - rezistenca z zaščito tarčnega mesta

Martinez-Martinez s sodelavci je leta 1998 raziskoval lastnosti plazmida pMG252 izoliranega leta 1994 iz patogenega seva *K. pneumoniae* iz ZDA. Po konjugativnem prenosu tega plazmida se je MIK recipientskega seva *E. coli* proti različnim kinolonom zvišala za 8 do 125-krat. Gen, ki posreduje to rezistenco so poimenovali *qnr* (*qnr* – ang.; quinolone resistance). Čeprav zapis ni zagotovil rezistence proti klinično predpisani koncentraciji kinolonov, ampak je omogočil zadostno zaščito za razvoj sekundarnih mutacij na kromosому. Martinez-Martinez s sodelavci je tudi dokazal, da so spontane mutacije v genih

za DNA-girazo pri *E. coli* s plazmidom, ki ima zapis za determinanto *qnr* kar stokrat bolj pogoste kot pri *E. coli* brez tega gena.

Protein Qnr (kasneje zaradi novo odkritih različic preimenovan v QnrA) je sestavljen iz 218 aminokislin in spada v družino proteinov s tandemskimi ponovitvami petih aminokislin. 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 ta manj učinkovito prepozna tarčo. V primeru vezave proteina Qnr na kompleks DNA-giraza-kinolon se ta destabilizira (Tran in sod., 2005a, 2005b).

V družini proteinov s tandemskimi ponovitvami petih aminokislin je poleg Qnr še več kot 500 drugih proteinov, katerih funkcija v celici večinoma ni znana. Eden izmed njih je protein McbG, ki se s QnrA ujema v 19,6-odstotkih aminokislin. McbG ščiti bakterije pred delovanjem mikrocina B17, ki ga same proizvajajo. Delovanje mikrocina B17 pa je podobno delovanju kinolonov (Heddle in sod., 2001).

Protein MfpA, ki ga uvrščamo v isto proteinsko družino, je bil sprva odkrit na kromosому bakterije *Mycobacterium smegmatis* in se s QnrA ujema v 18,9-odstotkih aminokislin. Ugotovili so, da je tridimenzionalna struktura encima in površinska razporeditev naboja zelo podobna DNA. Z DNA torej tekmuje za vezavno mesto na girazi. Ko so v poskusih protein MfpA izrazili na plazmidu pod kontrolo močnega promotorja, se je pri sevih s tem plazmidom rezistenca proti ciprofloxacinu povečala za 6 do 8-krat (Hegde in sod., 2005).

Po prvem odkritju gena *qnrA* pri *K. pneumoniae* v Alabami so prisotnost tega gena preverjali pri kliničnih izolatih patogenih sevov po vsem svetu. Prvo večjo epidemiološko raziskavo je izvedel Jacoby s sodelavci (2003). V njej je bilo pregledanih več kot 350 kliničnih izolatov po Gramu negativnih bakterij zbranih v devetdesetih letih prejšnjega stoletja v 19 različnih državah. Gen *qnr* je bil prisoten le pri 4 sevih *E. coli* in 2 sevih *Klebsiella sp.*, izoliranih v istem letu in isti bolnišnici kot prvotno odkriti sev. Številni raziskovalci po svetu, ki so z verižno reakcijo s polimerazo (PCR – ang.: polymerase chain reaction) ugotavljali prisotnost gena *qnr* pri klinično izoliranih sevih, so ugotovili zelo nizko prevalenco tega gena. Izjema so sevi z ESBL, pri katerih so ga zasledili kar v 20-odstotkih (Robicsek in sod., 2006a).

Gen *qnr* so odkrili pri sevih z vseh naseljenih kontinentov razen Južne Amerike. Odkrili so ga pri enterobakterijah iz številnih klinično pomembnih rodov (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii* in *Providencia stuartii*). Gena *qnr* pa niso še nikoli odkrili pri sevih: *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter sp.*, ki pa so kot klinični patogeni ravno tako pogosti kot rodova *Klebsiella* in *Escherichia*. Razlog je lahko dejanska odsotnost gena ali pa zgolj premajhno število pregledanih sevov (Jacoby in sod., 2003 in Poirel in sod., 2005).

Prvo uradno poročilo o prisotnosti gena *qnr* v Evropi je prišlo iz Pariza. Mammeri in sodelavci (2005) so gen našli pri le dveh od 449 proti nalidiksični kislini rezistentnih sevov enterobakterij. O največji prevalenci gena *qnr* so poročali iz Nizozemske, kjer so pri izbruhu epidemije bolnišničnih infekcij z bakterijo *Enterobacter cloacae*, *qnr* zaznali kar pri 98-odstotkih vseh izoliranih sevov. Zanimivo pa je, da je bil dokazan tudi pri 31-odstotkih nepatogenih po Gramu negativnih bakterij, izoliranih iz istih bolnikov (Paauw in sod., 2006).

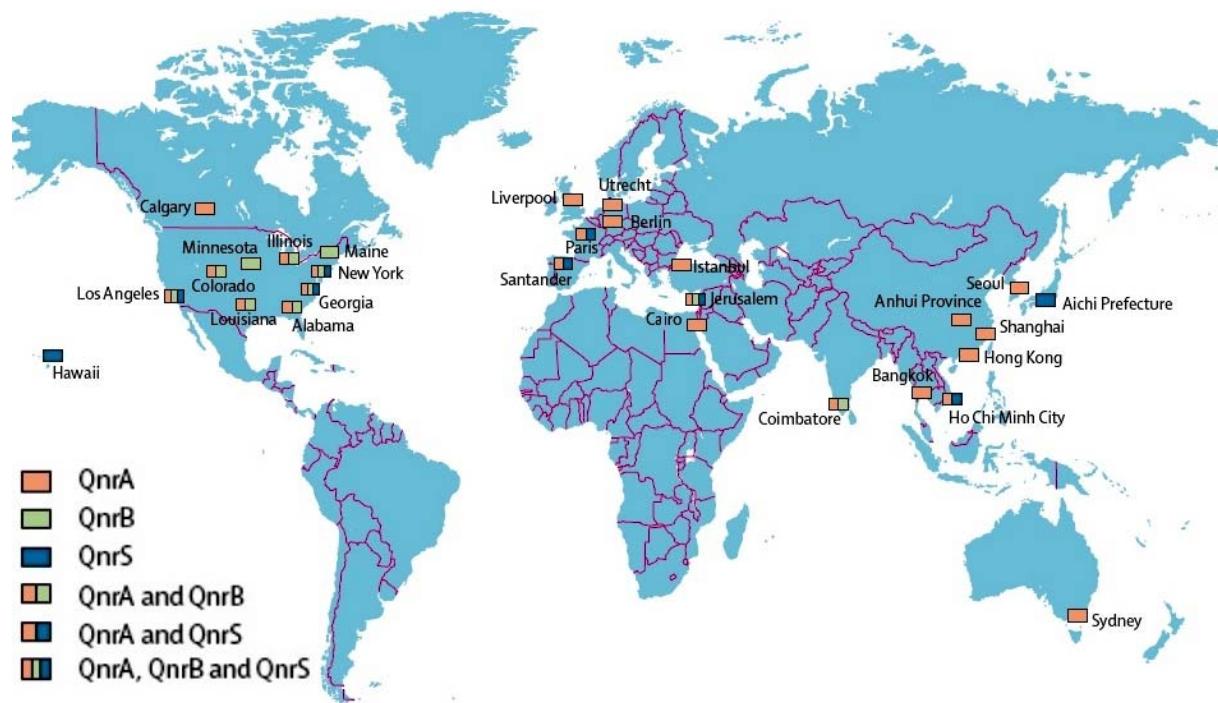
Sprva je gen *qnr* veljal za ohranjenega, saj so v ZDA, Evropi in na Kitajskem odkrili le eno različico, ki se je od osnovne različice *qnrA* razlikovala le v tihi mutaciji na enim baznem paru (Wang in sod., 2004 in Mammeri in sod., 2005). Nordman in sodelavci (2005) pa so pri *K. oxytoca* iz Kitajske odkrili različico gena *qnr*, ki se je od osnovne razlikoval v štirih baznih parih. Poimenovali so jo *qnrA2*, osnovno različico pa preimenovali v *qnrA1*.

Oktobra 2003 so na Japonskem pri le enem od osmih sevov bakterije *Shigella flexneri* izoliranih 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). Leto kasneje so Jacoby in sodelavci (2006) pri *K. pneumoniae* odkrili novo različico gena imenovano *qnrB*. Produkt gena je 226 aminokislin velik protein, 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., 2006a).

Robicsek in sodelavci (2006b) so z multipleks PCR prvi preverjali prisotnost vseh treh determinant *qnr* hkrati. Od 313 izolatov proti ceftazidimu rezistentnih enterobakterij, zbranih v letih 1999-2004 so gene *qnr* našli pri 4-odstotkih *E. coli*, 20-odstotkih *K. pneumoniae* in 31-

odstotkih *Enterobacter sp.* Zapisa za *qnrA* in *qnrB* sta bila prisotna v enakem razmerju, *qnrS* pa ni bil prisoten pri nobenem od testiranih sevov.

Pri študijah sevov izoliranih v Vietnamu so našli zapis za *qnrA* ali *qnrS* pri 25-odstotkih sevov *E. coli* in kar 85-odstotkih sevov *K. pneumoniae*. Vsi testirani sevi so imeli tudi  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Zadnja poročila iz Evrope kažejo, da je pri kliničnih izolatih enterobakterij gen *qnrS* bolj pogosto prisoten kot *qnrA* (Robicsek in sod., 2006a).

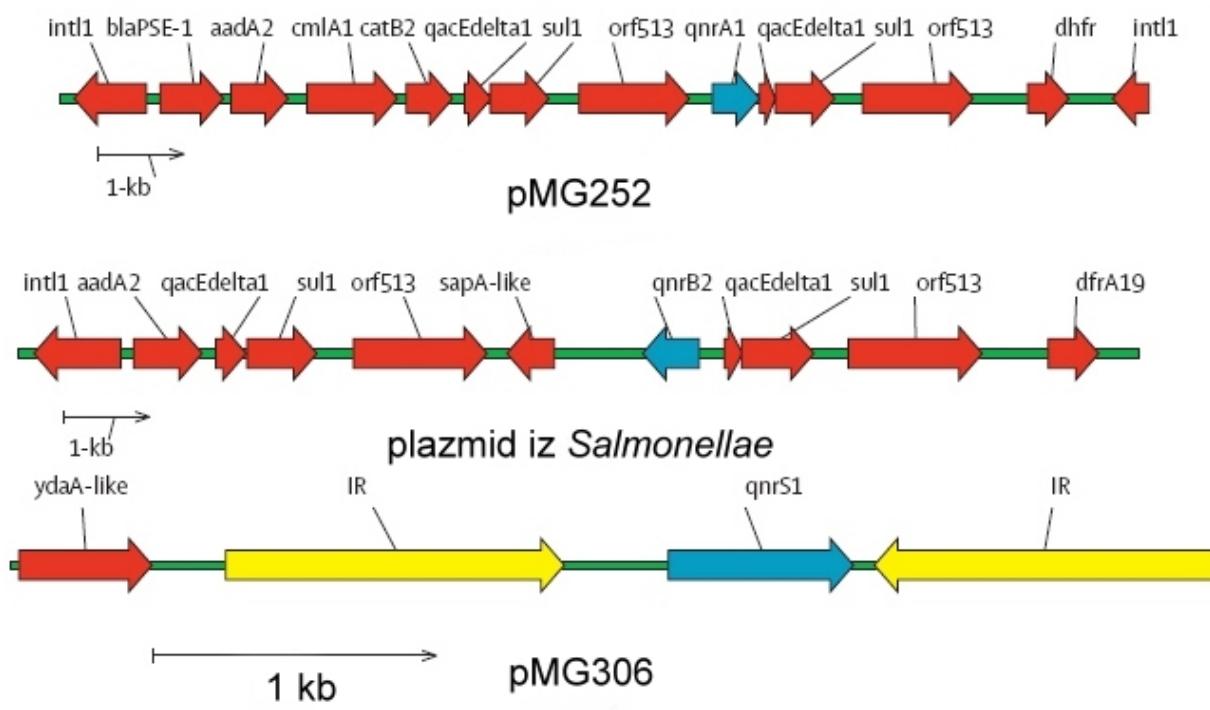


Slika 1. Svetovna razširjenost determinant QnrA, QnrB in QnrS ( Robicsek in sod. 2006a).

Plazmidi z geni *qnr* se razlikujejo po velikosti in prisotnosti genov za rezistenco proti različnim drugim protimikrobnim učinkovinam. Gen *qnrA* je na plazmidu v sklopu integronu podobne strukture tipa *sul-1* in z obeh strani obdan z genom za domnevno rekombinazo *orf513*. V običajnih integronih so geni za rezistenco prisotni v okviru genskih kaset, skupaj z 59 baznih parov dolgim zaporedjem, ki omogoča rekombinacijsko vstavljanje posameznih kaset v integron. Ker v okolini gena *qnr* tega zaporedja ni, ostaja mehanizem s katerim se je gen vstavil na plazmid zaenkrat nepojasnjen. Nenavadna razporeditev genov okoli

determinante *qnr* pri vseh plazmidih izoliranih zadnjih desetih let, kaže na to, da je bil izvor gena vedno enak, do sprememb na lokalnem nivoju pa je prišlo kasneje (Collis in Hall, 1995). Gen *qnrS* na plazmidu ne leži v integronskem okolju, ampak ga z vsake strani obdaja po ena obrnjena ponovitev, ki pojasni mehanizem vstavitve tega gena v plazmid (Gay in sod., 2006).

Zanimiva je povezava med rezistenco proti kinolonom in rezistenco proti novejšim cefalosporinskim antibiotikom. Skoraj vedno je na plazmidu poleg gena *qnr* prisoten tudi gen za  $\beta$ -laktamaze razširjenega spektra iz skupine CTX-M, FOX, SHV ali VEB. Gen *qnr* in geni za  $\beta$ -laktamaze so na plazmidih večinoma prisotni v sklopu različnih integronov. Znan je le en primer ko sta *qnrA* in  $\beta$ -laktamaza VEB-1 prisotna v istem integronu (Robicsek in sod., 2006a).



**Slika 2 .** Genetsko okolje genov *qnr* ( Robicsek in sod. 2006a) Na sliki je prikazana okolica genov *qnrA1*, *qnrB2* in *qnrS1*. Oznake genov in drugih delov DNA na posameznih izsekih so: *aadA2* –aminoglikozid adenililtransferaza, *blaPSE-1*–PSE-1  $\beta$ -laktamaza, *catB2*–kloranfenikol acetiltransferaza, *cmlA1*– gen za neencimsko rezistenco proti kloranfenikolu, *dfr* in *dhfr*–dihidrofolat reduktaza, *intI1*–integraza razreda 1, *IR*–obrnjena ponovitev, *Orf*–odprt bralni okvir, ki kodira protein neznanе funkcije, *orf513*– domnevna rekombinaza, *qacE11*–protein za rezistenco proti kvartarnim amonijevim spojinam, *qnr*–protein za rezistenco proti kinolonom, *sapA*–komponenta permeaze za transport peptidov, *sull*–dihidropteroat sintetaza. Velikost posameznih plazmidov je nakazana z 1kb puščico.

Ko je Poirel s sodelavci (2005) raziskoval izvor genov *qnr* je na kromosomu pri po Gramu negativni vodni bakteriji *Shewanella algae* odkril 4 različice gena *qnrA* (*qnrA2-A5*). Pri *S. algae*, ki so imele enega od alelov, je bila toleranca na kinolone 4 do 8-krat višja kot pri sevu iz istega rodu, brez zapisa za *qnr*. Ker se odstotek G-C baznih parov pri *S. algae* popolnoma ujema z G-C gena *qnrA*, so zaključili, da je bakterija *S. algae* najbolj verjeten vir gena *qnr* v naravi.

Raziskovalci predpostavljajo, da v naravi protein Qnr ščiti bakterije pred naravnimi inhibitorji DNA-giraze, kot je naprimer 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).

#### **2.6.2.3.2 PMQR - rezistenca s kemijsko modifikacijo kinolonov**

Vsi zgoraj opisani mehanizmi rezistence proti kinolonom so dokaj nespecifični. Wetzstein in sodelavci (1999) so opisali prisotnost specifičnih encimov za metabolno razgradnjo kinolonov pri nekaterih glivah, pri bakterijah pa takih encimov niso našli.

Robicsek in sodelavci (2006c) so odkrili, 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 mutageneze odkrili zapis, ki je odgovoren za dodaten porast rezistence. Po analizi nukleotidnega zaporedja so opisali novo različico gena za aminoglikozidno acetiltransferazo (*aac(6')-lb*), ki so jo označili kot gen *aac(6')-lb-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 (Robicsek in sod., 2006c).

Od leta 1968 je bilo opisanih več kot 30 različic gena *aac(6')-lb*, vse so aminoglikozidne acetiltransferaze, ki s prenosom acetilne skupine na dušikov atom aminoglikozidov, kot so kanamicin, amikacin in tobramicin, onemogočajo njihovo aktivnost. Zaradi sprememb v

omenjenih dveh kodonih pri različici *aac(6')-lb-cr* se je pojavila dodatna encimska aktivnost. Produkt tega gena je sposoben acetilacije fluorokinolonov kot sta ciprofloksacin in norfloksacin na dušikovem atomu piperazinilne substituente na mestu 6. Na ta način inaktivira le kinolone pri katerih je piperazinilna skupina prisotna, proti ostalim kinolonom pa ne kaže nobene aktivnosti (Robicsek in sod. 2006c).

Mutaciji v omenjenih dveh kodonih povzročita dvig minimalne inhibitorne koncentracije recipientskega seva *E. coli* za 3 do 4-krat. Če pa je mutacija prisotna le na enem od obeh kodonov pa se MIK dvigne le za dvakrat. Stopnja rezistence, ki jo produkt gena *aac(6')-lb-cr* posreduje je nizka, vendar podobno kot Qnr, omogoča lažje preživetje pri mejnih koncentracijah protimikrobne učinkovine, pri katerih se pojavljajo mutacije na kromosому. Tako se lahko pojavijo rezistentnejše mutante.

Na račun pridobitve nove aktivnosti produkta gena *aac(6')-lb-cr* pride do zmanjšane učinkovitosti inaktivacije aminoglikozidov. MIK pri kanamicinu se zmanjša na četrtino prvotne, pri tobramicinu in amikacinu pa na polovico. Le pri slednjem pride do izgube rezistence proti klinični koncentraciji antibiotika (Robicsek in sod., 2006c).

Gen *aac(6')-lb-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 (2003a) na Kitajskem. Našli so ga pri kar polovici multirezistentnih sevov *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 in Boyd, 2004).

Nadalje so Robicsek in sodelavci (2006c) preučili zbirkovo 78 proti kinolonom rezistentnih kliničnih sevov *E. coli*, izoliranih v Šangaju. Štirje sevi od šestih, so poleg gena *qnrA* imeli tudi zapis za alel *aac(6')-lb-cr*. Prisotnost gena *aac(6')-lb* so preverili tudi pri ostalih 72 izolatih, pri katerih gena *qnrA* na plazmidu niso našli. Pri 43 sevih (60-odstotkov) je bil *aac(6')-lb* prisoten, od tega pri 36 sevih (84-odstotkov) v *aac(6')-lb-cr* različici. Pri zbirki sevov iz Shangai-ja je bil torej gen *aac(6')-lb-cr* mnogo bolj pogost kot *qnrA*. Slednji se je

pojavil le pri 7,7-odstotkih sevov, *aac(6')-lb-cr* gen pa se je pojavil kar pri 51-odstotkih sevov, skupaj ali neodvisno od *qnra* determinante.

Večjo zbirkko (313) kliničnih sevov enterobakterij izoliranih v Severni Ameriki so preučili Park in sodelavci (2006). Pri tem so ugotovili, da ima 50-odstotkov sevov zapis za gen *aac(6')-lb*, 28-odstotkov od tega je *aac(6')-lb-cr* različice. Prisotnost genov *qnr* pri 16-odstotkih *aac(6')-lb-cr* pozitivnih sevih in 24,5-odstotkih *aac(6')-lb-cr* negativnih sevih je dodaten dokaz da se gen *aac(6')-lb-cr* pojavlja popolnoma neodvisno od gena za Qnr. Alel *aac(6')-lb-cr* je močno razširjen, saj je ob več kot tridesetih obstoječih alelih ta različica zastopana v kar tretjini primerov. Genetska zgradba plazmidov na katerih kroži gen *aac(6')-lb-cr* še ni dobro poznana, pri do sedaj raziskanih plazmidih pa je bil ta gen vedno prisoten v sklopu integrona (Robicsek in sod., 2006c).

## 2.7 SULFAMETOKSAZOL-TRIMETOPRIM

### 2.7.1 Delovanje sulfametoksazol-trimetoprima

Sulfametoksazol-trimetoprim je kombinacija dveh učinkovin, sulfametoksazola in trimetoprima, ki je znana kot zdravilo Primotren. Sulfametoksazol je protimikrobnna učinkovina iz skupine sulfonamidov. Deluje kot kompetitivni inhibitor encima dihidropteorat sintetaze. Zaradi vezave na mesto za paraaminobenzojsko kislino prepreči sintezo dihidropteorata in s tem sintezo DNA. Trimetoprim je bakteriostatična učinkovina, ki sodi v skupino diaminopiridinov in je analog tetrahidrofolne kisline. Zavira delovanje bakterijske dihidrofolat reduktaze in onemogoči pretvorbo dihidrofolata v tetrahidrofolat. Obe učinkovini zavirata metabolizem tetrahidrofolne kisline. Tetrahidrofolna kislina je prekursor za sintezo purinov in pirimidinov, zato je sinteza teh ob uporabi kombinacije obeh učinkovin učinkovito preprečena (Murray in sod., 1999 in Silva, 1996).

### 2.7.2 Mehanizmi rezistence proti sulfametoksazol-trimetoprimu

Pri enterobakterijah je klinično najpomembnejši mehanizem rezistence proti sulfametoksazol-trimetoprimu povečana sinteza na plazmidu kodiranega encima dihidrofolat reduktaze. Ostali mehanizmi vključujejo: spremembo dihidrofolat reduktaze z mutacijo, spremenjeno prepustnost celice ter inaktivacijo protimikrobnne učinkovine. Pri nekaterih bakterijah se z

mutacijo razvije nova metabolna pot, zaradi katere je bakterija sposobna privzemati folat iz okolice. Geni za rezistenco proti sulfametoksazol-trimetoprimu so zelo pogosto prisotni kot del integronov. (Silva 1996, in Murray in sodelavci, 1999).

## 2.8 INTEGRONI

Integroni so genetske strukture, ki so zmožne prepoznavanja in vključevanja prostih genskih kaset z geni za rezistenco proti različnim protimikrobnim učinkovinam. So vrsta mobilnih genetskih elementov, ki sodelujejo pri horizontalnem širjenju genov za rezistenco.

Integron je sestavljen iz ohranjenega odseka na 5' koncu in enega ali več delov z zapisom za rezistenco na 3' koncu. Posamezni zapis z 59 baznih parov dolgim rekombinacijskim mestom se imenuje genska kasetta. Genska kasetta lahko obstaja kot prosta krožna molekula, ki največkrat ne vsebuje promotorske regije in je odvisna od promotorja na integronu. Danes je znanih preko 60 genskih kaset z geni za rezistence proti protimikrobnim učinkovinam iz skoraj vseh poznanih skupin. Na starnem delu integrona je gen *int*. To je zapis za mestno specifično rekombinazo, ki jo uvrščamo v družino integraz in je sposobna vključevanja proste genske kasete preko rekombinacijskega mesta *attI*, ki leži 104 baznih parov navzgor od gena *int* (Collis in sod., 1995).

Izražanje genov, ki so v genskih kasetah je uravnavano s promotorsko regijo na 5' koncu integrona. Sestavljata jo glavni promotor P1 in drugotni šibkejši promotor P2, ki leži 119 baznih parov navzdol od prvega. Znanih je več različic promotorja P1 (šibka, močna in več hibridnih), ki se razlikujejo v sposobnosti iniciacije transkripcije. Promotor P2 je lahko prisoten v aktivni ali neaktivni različici. Prisotnost različno močnih promotorjev je, poleg števila kopij plazmida, eden izmed mehanizmov kontrole jakosti izražanja genov za rezistenco (Levesque in sod., 1994).

Glede na gene za integrizo razvrščamo integrone v 4 razrede (razred 1, 2, 3 in 4), od katerih je najpogostejši razred 1. Gen za integrizo razreda 2 vsebuje zgodnji stop kodon, zato tvori nepopoln encim, ki ni sposoben izmenjave genskih kaset. Integrone iz razreda 4 najdemo večinoma le pri bakteriji *Vibrio cholerae* in niso povezani z rezistenco proti protimikrobnim učinkovinam (Arakawa in sod., 1995 in Mazel in sod., 1998)

Največkrat imajo bakterije le en tip integrona, včasih pa tudi dva ali več. Locirani so na plazmidih in transpozoni, kar omogoča več načinov horizontalnega širjenja genov za rezistenco; vključevanje genskih kaset v genom z integrazo, premikanje integrona s kaseto po genomu, razširjanje integronov na transpozoni in konjugativni prenos plazmida z integronom znotraj vrst ali med vrstami. Vsi ti procesi so pomembni pri evoluciji bakterijskega genoma. Prenos integrona v sklopu transpozona ali plazmida je bolj pogost dogodek kot nastanek novih integronskeih struktur z rekombinacijsko vstavitvijo genske kasete (Minakhina in sod., 1999 in Martinez-Freijo, 1998).

White in Rawlinson (2001) sta pri pregledu 120 uropatogenih sevov enterobakterij odkrila en integrone razreda 1 pri 36-odstotkih sevov, trije odstotki sevov so imeli dva različna integrona razreda 1, šest odstotkov sevov je imelo integrone razreda 1 in 2, štiri odstotke sevov pa le integrone razreda 2. Najpogosteje kasete, ki jih najdemo v integronih razreda 1, so kasete tipa *aadA* z geni za rezistenco proti streptomycinu in spektinomocinu. Te antibiotike se danes uporablja zelo redko, pa vendar so geni za rezistenco proti njim še vedno zelo razširjeni. Vzrok za to je verjetno ko-selekcija z drugimi rezistentnimi. Kljub odsotnosti selekcijskega pritiska gen ostane v integronu in se ne odstrani z rekombinacijo. Ko pa se selekcijski pritisk spet pojavi se gen s pomočjo integraze premakne s 3' konca na 5' konec, kjer se zaradi bližine promotorja spet izrazi. Opisani pojav so znanstveniki poimenovali genetski spomin (Collis, 1995).

Poleg *aadA* so prisotne še kasete tipa *aadB* z aminoglikozid adeniltransferazo, ki posreduje rezistenco proti gentamicinu, kanamicinu in tobramycinu. Pogosto jih zasledimo pri sevih *K. pneumoniae* z ESBL. Pri uropatogenih sevih so še posebej pogoste kasete tipa *dfr*, z geni za rezistenco proti trimetoprimu, ki je najpogosteje zdravilo za zdravljenje infekcij sečil (White in Rawlinson, 2001).

Različne raziskave kažejo, da število odkritih integronov z leti narašča, še posebej pri kliničnih izolatih enterobakterij, na katere deluje močan selekcijski pritisk. Narašča tudi velikost vstavljenih genskih kaset, saj se v genskih kasetah pojavljajo geni za vedno nove protimikrobine učinkovine. Opaziti je tudi vedno večji pojav močnega promotorja P1 v kombinaciji z aktivnim promotorjem P2 (Schmitz in sod., 1999).

## 2.9 BAKTERIOCINI PRI BAKTERIJAH *Klebsiella sp.* - KLEBICINI

Bakteriocini so bakterijski proteinski toksini, ki onemogočajo rast enakih ali sorodnih vrst bakterij. Odkril jih je A. Gratia leta 1925, ko je iskal način za preprečevanje rasti bakterij. Pri tem je našel učinkovino, ki je zavirala rast *E. coli* in jo poimenoval kolicin (Gratia, 2000).

Znanih je mnogo različnih bakteriocinov, ki so razdeljeni glede na bakterijske seve, ki jih izločajo, mehanizem delovanja ali mehanizem rezistence proti njim. Prisotni so pri večini po Gramu pozitivnih in negativnih bakterijah, ter pri arhejah. Najbolj raziskani so bakteriocini pri *E. coli*, imenovani kolicini. Prvi opisan kolicin je bil kolicin V, ki so ga kasneje uvrstili v skupino mikrocinov, saj se od ostalih kolicinov razlikuje po velikosti in načinu izločanja iz bakterijske celice. Genski zapis za kolicine je skoraj vedno na plazmidu. Na kolicinskem operonu je skupaj z genom za sam kolicin še gen za imunost proti kolicinu in gen, ki omogoča sproščanje kolicina iz celice, oziroma lizo celice. Gen za imunost se prepisuje stalno, gen za sam kolicin pa je pod kontrolo SOS in še nekaterih drugih regulacijskih sistemov. Prevladajoči način izločanja kolicinov iz celice je avtoliza celice z litičnimi proteini. Nekatere študije kažejo, da se kolicini izločajo le pri bakterijah z močno poškodovano DNA, ki so že obsojene na propad (Riley in Wertz, 2002).

Bakteriocini z majhno molekulsko maso se imenujejo mikrocini. Mikycin B17 je posttranslacijsko spremenjen, 3,1-kDa velik peptid. Mehanizem delovanja mikrocina B17 je enak delovanju ciprofloksacina, saj deluje na DNA-girazo in preprečuje pravilno superzvijanje DNA. Proteini za imunost proti mikrocincu B17 so McbE in McbF, ki zmanjšujejo količino mikrocina v celici in pa McbG, ki zaščiti DNA girazo pred delovanjem mikrocina B17. Mehanizem zaščite giraze je podoben kot pri proteinu Qnr, s katerim se ujema v 19,6-odstotkih aminokislin (Heddle in sod., 2001).

Bakteriocini pri bakterijah iz rodu *Klebsiella* se imenujejo klebicini. Pri bakteriji *K. pneumoniae* sta jih odkrila Hamon in Peron v šestdesetih letih dvajsetega stoletja (Bauernfeind, 1981). Slopek je leta 1978 prvi uporabil občutljivost proti klebicinom kot orodje za tipizacijo sevov iz rodu *Klebsiella* v epidemioloških raziskavah. Pregledoval je občutljivost preiskovanih sevov za 15 različnih klebicinov, vendar je na ta način lahko tipiziral le 58,5-odstotkov od 504 preiskovanih sevov. Čeprav je ta način tipizacije enostaven, dokaj hiter in poceni, je nepopoln, saj nikoli ni možno tipizirati vseh sevov. Najvišjo

učinkovitost tipizacije s klebicini sta dosegla Edmondson in Cooke (1979). Uspela jima je pri 96,8-odstotkih sevov. Poleg tega so rezultati tipizacije s klebicini precej neponovljivi, saj je produkcija klebicinov pogosto variabilna (Bauernfeind, 1981).

Medtem ko je o kolicinah znanega zelo veliko vključno s kristalografskimi strukturami proteinov in mehanizmom delovanja, je o klebicinih v literaturi dostopnih zelo malo podatkov.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

###### 3.1.1.1 Laboratorijski sevi

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali laboratorijske seve *E. coli* iz zbirke Katedre za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. V preglednici 3 so navedeni uporabljeni sevi s pripadajočimi genotipi.

**Preglednica 3.** Laboratorijski sevi *E. coli*, ki smo jih uporabljali pri delu.

sev <i>E. coli</i>	plazmid	genotip seva	vir
J53	pMG252 qnr	Az <sup>r</sup>	G. A. Jacoby
RU4404	/	MM294 zxy::Tn1725 Cm <sup>r</sup> thi endA hsdR	R. Schmidt
TOP10	/	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hcdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 lacX74 ecA1deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rps(Sm <sup>r</sup> ) endA1	Invitrogen
HB101	pUC19	supE44 hsdS20(r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1	Promega
CL213	pR388 Tp,Su	met	De la Cruz
DH5	/	F'/endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) glnV44 tnl1 recA1 gyrA(Nalr) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR(Φ80dlacΔ(lacZ)M15)	Fermentas
MC4100	/	F <sup>-</sup> araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 (Str <sup>r</sup> )relA1 fblB5301 deoC1 ptsF25 rbsR	Fermentas

###### 3.1.1.2 Klinični izolati uropatogenih ESBL producirajočih sevov *Klebsiella sp.*

V raziskavi smo uporabili klinične izolate uropatogenih ESBL producirajočih sevov *Klebsiella sp.* (sevi klebsiel z ESBL). Sevi so bili zbrani v letih 2000-2005 v različnih zdravstvenih ustanovah (domovi starejših občanov, zdravstveni domovi, urološka ambulanta na polikliniki, bolnišnica Trbovlje) in identificirani v Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) v Ljubljani.

### 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 antibiotikom.

Osnovno gojišče smo pripravili tako, kot je opisano v odstavku 3.1.2.2. Na približno 55°C ohlajenemu gojišču smo sterilno dodali željeni antibiotik, do končne koncentracije, ki je navedena v preglednici 4.

**Preglednica 4.** Založne in končne koncentracije antibiotikov v gojišču LB

antibiotik	založna konc. (mg/ml)	konča konc. v gojišču (µg/ml)
natrijev azid	150	150
ampicilin	100	100
tetraciklin	10	10
trimetoprim	10	10
kloramfenikol	50	20
norfloksacin	10	0,1
ciprofloksacin	10	0,06
kanamicin	10	30

### 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 technical)
- BHI (brain heart infusion)

### BIO-RAD

- SDS

### FERMENTAS

- PCR Master Mix (0,05 enot/ $\mu$ l Taq DNA polimeraze v reakcijskem pufru: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))
- standardna DNA lestvica 1 kb
- standardna DNA lestvica 100 bp
- standardna DNA lestvica 50 bp
- destilirana voda brez nukleaz
- nanašalni elektroforezni pufer

### GENOMED GmbH

- JET quick – komplet za čiščenje reakcijskih mešanic PCR

## KEMIKA

- glukoza
- EDTA
- ledocetna kislina

## LEK

- tetraciklin

## MERCK

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

## QIAGEN

- komplet za izolacijo plazmidne DNA QIAGEN Plasmid Midi Kit

## RIEDEL DE HAËN

- borova kislina

## ROCHE

- DIG DNA označevalni in detekcijski kit
- DNA marker VI, označen z digoxigeninom

## 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
- norfloksacin
- kloramfenikol
- lauroyl sarkozin

### 3.1.4 Encimi

#### FERMENTAS

- *RsaI*
- *PstI*
- *HinfII*
- *TaaI*
- *NdeI*
- T4 DNA ligaza

### 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:

- **5 X TBE** (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), ki smo ga avtoklavirali in 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).

### 3.1.5.3 Hibridizacija s sondom *qnr*

#### 3.1.5.3.1 Izolacija vzorčne genomske DNA

- **pufer TE** (10 mM TRIS-Cl, 1 mM EDTA),
- **raztopina GES** (5 M gvanidinijev tiocianat, 0,1 M EDTA (pH 8), 0,5-odstotni lauroyl sarkozin (v/v)),
- **7,5 M amonij acetat**,
- **raztopina KI** (kloroform-izoamilalkohol v razmerju 24:1),
- **raztopina FKI** (fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1),
- **izopropanol**,
- **80-odstotni etanol**,
- **pufer TE z RNazo** (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza).

### 3.1.5.3.2 Kapilarni prenos razrezane vzorčne DNA z gela na nitrocelulozno membrano »Southern blot«

- **depuracijska raztopina** (0,25 N HCl),
- **denaturacijska raztopina** (1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH),
- **nevtralizacijska raztopina** (0,5 M Tris (pH 7,4), 1,5 M NaCl),
- **raztopina za prenos (20 X SSC)** (3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat (pH 7)),
- **raztopina za spiranje membrane (2 X SSC)** raztopina za prenos redčena, v razmerju 9:1.

### 3.1.5.3.3 Hibridizacija in posthibridizacijska spiranja

- **hibridizacijska raztopina** (250 ml 20 X SSC, 10 g blocking reagent, 1 g lauroyl sarkozin, 0,2 g SDS v 1000 ml vode),
- **raztopina za posthibridizacijsko spiranje I** (2 X SSC, 0,1-odstotni SDS),
- **raztopina za posthibridizacijsko spiranje II** (0,5 X SSC, 0,1-odstotni SDS)

### 3.1.5.3.4 Imunološka detekcija vezane sonde

- **raztopina A** (0,1 M maleinska kislina (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 0,3-odstotni(w/v) Tween 20),
- **raztopina B** (10-odstotni »blocking reagent« raztopljen v maleinskem pufru (0,1 M maleinska kislina, 0,15 M NaCl (pH 7,5))),
- **raztopina C** (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl); pH 9,5,
- **raztopina Ces** (10 ml raztopine C z dodanimi 200 µl raztopine NBT/BCIP (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine))

## 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 bakterijskih lizatov za izvedbo PCR

1 mililiter prekonočne bakterijske kulture smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in jo centrifugirali 2 minuti pri 13.000 vrt./min pri sobni temperaturi. Odpipetirali smo ves supernatant in usedlini bakterij dodali 100 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 ponovno centrifugirali 10 minut pri 14.000 vrt./min v namizni centrifugji pri sobni temperaturi. Supernatant, v kateri je celokupna genomska DNA, smo uporabili kot vzorčno DNA pri polimerazni verižni reakciji.

#### 3.2.1.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

V preglednici 5 so prikazani začetni oligonukleotidi (Jenu Bioscience, Gmblt, Nemčija), ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov s PCR

**Preglednica 5.** Začetni oligonukleotidi , ki smo jih uporabili pri PCR, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost nastalega PCR pomnožka.

oznaka začetnega oligonukleotida	nukleotidno zaporedje	velikost PCR pomnožka
qnrA1 (F)	5'-ATCCAGATCGGCAAAGGTTA-3'	
qnrA2 (R)	5'-GATAAAGTTTTCAGCAAGAGGG-3'	543 bp
qnrB1 (F)	5'-ATGACGCCATTACTGTATAA-3'	
qnrB2 (R)	5'-GATCGCAATGTGTGAAGTTT- 3'	562 bp
qnrS1 (F)	5'-TTCATTCGCAGCGACTTTC-3'	
qnrS2 (R)	5'-AATTGCCCCCAGACATCTTC-3'	434 bp
qac1 (F)	5'-GGCATCACTGCGTGTGCGTCG-3'	
qac2 (R)	5'-GACTGAGCATGACCTTGCG-3'	514 bp
pIKREco (F)	5'-CCGAATTCACTTAGGCATCACT-3'	
pIKFEco (R)	5'-CCGAATTCACATGAGCAACGC-3'	600 bp
hep35 (F)	5'-TGCGGGTYAARGATBTKGATTT-3' *	
hep36 (R)	5'-CARCACATGCGTRTARAT-3' *	491bp

\* začetni oligonukleotidi so degenerirani: R= A ali G,

B= C, G ali T

Y= C ali T

K= G ali T

### 3.2.1.3 Sestava reakcijskih mešanic za reakcijo PCR

Reakcijske mešanice za pomnoževanje delov genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* smo pripravili tako, da smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 5 µl bakterijskega lizata, 2 µl izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/µl), 2 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 3,5 µl destilirane vode.

Za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje delov genov *intI1*, *intI2* ali *intI3* pa smo v 200 µl mikrocentrifugirke odpipetirali 3 µl bakterijskega lizata, 1 µl začetnega oligonukleotida F (10 pmol/µl), 1 µl začetnega oligonukleotida R (10 pmol/µl), 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas) in 7,5 µl destilirane vode.

### 3.2.1.4 Pogoji za PCR

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* s pari začetnih oligonukleotidov *qnrA1/qnrA2*, *qnrB1/qnrB2* in *qnrS1/qnrS2*.

začetna denaturacija	95°C	2,5 minut	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	64°C	30 sekund	30×
pomnoževanje	72°C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr* s pari začetnih oligonukleotidov *qac1/qac2* in *pIKREco/pIKFEco*.

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

- Pogoji za pomnoževanje delov genov *intI1*, *intI2* ali *intI3* s parom degeneriranih začetnih oligonukleotidov *hep35/hep36*.

začetna denaturacija	95°C	2,3 minut	1×
denaturacija	94°C	30 sekund	
prileganje začetnih oligonukleotidov	53°C	20 sekund	30×
pomnoževanje	72°C	40 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1×

### 3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza.

Z elektroforezo na agaroznih gelih smo preverjali velikost nastalih PCR pomnožkov ter fragmentov DNA po restrikciji. Preverjali smo tudi prisotnost plazmidne ali genomske DNA po izolaciji. Glede na analizo različne DNA smo pripravili gele z gostoto od 0,7 do 2-odstotka agaroze. Gel smo pripravili tako da smo ustrezni količini agaroze dodali pufer 1 X TBE , ter segrevali dokler se agarosa 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 shladi.

Pri analizi PCR pomnožkov smo uporabili 1-odstotni gel, kot označevalec velikosti smo dodali 1-kilobazno lestvico (Fermentas). V jamice smo vnesli po 5 µl PCR pomnožkov skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5:1. Elektroforeza je potekala pri napetosti 10 V/cm gela v pufru 1 X TBE.

Za analizo PCR pomnožkov po restrikciji in za analizo razrezane plazmidne DNA za plazmidne profile smo uporabili 1 do 2-odstotni gel, kot označevalec velikosti smo uporabili 1-kilobazno in/ali 100-bp lestvico (Fermentas). V jamice smo vnesli vzorec in nanašalni pufer v razmerju 20:1. Ločevali smo pri napetosti 6 V/cm gela, v pufru 1 X TBE.

Velikost izolirane plazmidne DNA smo ocenili po elektroforezi na 0,7-odstotnem agaroznem gelu. Za velikostni standard pri analizi plazmidne DNA ccc oblike smo uporabili izolirano DNA plazmida pR388. V jamice smo vnesli izolirano plazmidno DNA in nanašalni pufer v razmerju 10:1. Elektroforeza je potekala pri napetosti 8 V/cm gela v pufru 1 X TBE.

Po elektroforezi 1 kb lestvice (Fermentas) zasledimo fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250. Po elektroforezi 100 bp lestvice so fragmenti veliki 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 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.

### 3.2.3 Restriktivna analiza PCR pomnožkov

#### 3.2.3.1 Restriktivna 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 restriktivnimi 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 µl restriktivne mešanice smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 2 µl neočiščenega PCR pomnožka, 0,5 µl encima (*TaaI* ali *NdeI*), 1 µl ustrezne pufre za restriktijo (Fermentas) ter 6,5 µl deionizirane vode. Restriktija z encimom *TaaI* je potekala pri 65°C, restriktija z encimom *NdeI* pa pri 37°C. Obe restriktiji smo inkubirali približno 12 ur. Produkte restriktije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo na 2-odstotnem agaroznem gelu.

#### 3.2.3.2 Restriktivna analiza PCR pomnožkov dobljenih s parom začetnih oligonukleotidov hep35/hep36

Ker so začetni oligonukleotidi hep35/hep36 degenerirani, lahko z njimi pomnožimo dele genov za integraze različnih razredov integronov (*intI1*, *intI2*, *intI3*). Razlikujemo jih na podlagi velikosti nastalih fragmentov po restriktiji PCR pomnožkov z encimoma *RsaI* in *HinfI*.

Za pripravo 15 µl restriktivne mešanice smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 3 µl neočiščenega PCR pomnožka, 1 µl encima (*RsaI* ali *HinfI*), 2 µl ustrezne pufre za restriktijo (Fermentas) ter 9 µl deionizirane vode. Restriktivno mešanico smo inkubirali približno 12 ur pri 37°C, nato pa nastale fragmente ločili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5-odstotnem gelu.

### **3.2.4 Konjugacija klebsiel z ESBL**

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<sup>r</sup>, prek katerega smo na enak način razmazali posamezne donorske seve (uropatogeni sevi klebsiel z ESBL). 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, trimetoprimom ali kloramfenikolom (za selekcijo transkonjugant). Plošče smo inkubirali preko noči pri 37°C. Naslednji dan smo posamezne kolonije z zobotrebcem prepikirali na enaka gojišča. Po prekonočni inkubaciji pri 37°C smo plošče preko sterilne žametne krpe odtisnili na gojišče LB z natrijevim azidom in ciprofloksacinom oziroma z natrijevim azidom in norfloksacinom.

Nekatere primarne konjugante smo nato uporabili kot donorje pri sekundarni konjugaciji in poskušali njihove plazmide prenesti v recipientski sev *E. coli* RU4404 Cm<sup>r</sup>. Sekundarno konjugacijo smo izvedli na enak način kot primarno.

### **3.2.5 Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri izbranih sevih klebsiel z ESBL in njihovih primarnih transkonjugantah.**

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) smo ugotavljali tako, da smo prekonočne tekoče kulture transkonjugant, donorskih sevov, recipienta ter drugih kontrolnih sevov z vatirano palčko enakomerno nanesli na plošče trdnega gojišča LB. Na sredino gojišča smo nato previdno 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 MIK.

### **3.2.6 Ugotavljanje odpornosti proti kanamicinu**

Za ugotavljanje odpornosti proti kanamicinu smo prekonočno kulturo klebsiel z ESBL in vseh 27 transkonjugant do posamezne kolonije nacepili na trdno gojišče LB z dodanim kanamicinom v končni koncentraciji 30 µg/ml. Plošče smo preko noči inkubirali pri 37°C. Naslednji dan smo pregledali rast bakterij na gojišču za dodanim kanamicinom. Če so bakterije na gojišču s kanamicinom rastle smo jih označili za proti kanamicinu rezistentne. Če

so bakterije rastle slabo, ali pa sploh niso rastle, smo jih označili za kanamicin občutljive. Etesti za natančnejše določanje odpornosti proti kanamicinu nam niso bili dostopni.

### 3.2.7 Ugotavljanje prisotnosti gena *qnr* s hibridizacijo

Za hibridizacijo smo uporabili DIG-DNA komplet za označevanje in detekcijo (Roche).

#### 3.2.7.1 Priprava DNA sonde

Za sondu smo uporabili 542 bp dolg fragment z zapisom za gen *qnrA*, ki smo ga pomnožili iz plazmida pMG252.

- pripravili smo bakterijski lizat seva J53 s plazmidom pMG252
- po že opisanem protokolu smo s PCR pomnožili del gena *qnrA*
- PCR pomnožek smo očistili iz reakcijske mešanice s kompletom JET quick (Genomed GmbH)
- sondu smo označili z dioksigenin dUTP-jem (DIG-dUTP) z metodo naključnega naleganja heksanukleotidov »random priming«

Mikrocentrifugirko s 5 µl očiščenega PCR pomnožka in 10 µl destilirane vode smo postavili za deset minut v vrelo vodo in jo takoj nato prenesli v ledeno kopel. K denaturiranemu fragmentu smo dodali 2 µl mešanice naključnih heksanukleotidov, 2 µl dNTP označevalne mešanice in 1 µl Klenovega encima (Roche). Zmes smo dobro premešali in inkubirali preko noči pri 37°C. Naslednji dan smo reakcijo ustavili z desetminutno inkubacijo v vodni kopeli pri 65°C.

#### 3.2.7.2 Priprava vzorčne DNA

##### 3.2.7.2.1 Izolacija genomske DNA z gvanidinijevim tiocianatom

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali po 1 ml nasičene prekonočne bakterijske kulture vsakega od 103 sevov klebsiel iz naše zbirke, centrifugirali 2 minuti v namizni centrifugi pri 12.000 vrt./min ter nato odstranili supernatant. Postopek smo ponovili trikrat. Bakterije v usedlini smo resuspendirali v 100 µl pufra TE, dodali 500 µl raztopine GES, na kratko premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Celične lizate smo prestavili v ledeno vodno kopel in jih inkubirali nadaljnih 10 minut. K ohlajenim celičnim lizatom smo dodali 250 µl amonijevega acetata, na kratko premešali in ponovno inkubirali na ledu 10 minut. V

mikrocentrifugirko smo nato odpipetirali 500 µl mešanice kloroforma in izoamilalkohola (KI), vse skupaj premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in centrifugirali 4 minute pri 13.000 vrt./min in 4°C. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali zgornjo vodno fazo in ji dodali enako količino mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohola (FKI). Vsebino smo premešali in ponovno centrifugirali 4 minute pri 13.000 vrt./min in 4°C. Supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in ga ponovno očistili s FKI in nato še s KI po že zgoraj opisanem postopku. K supernatantu iz zadnje stopnje smo dodali 0,54 volumna hladnega izopropanola, ter centrifugirali 10 minut pri 13.000 vrt./min in 4°C. Izopropanol smo nato odlili in dodali 500 µl hladnega 80-odstotnega etanola. Ponovno smo centrifugirali, nato pa odstranili ves preostali etanol. Popolnoma posušeno oborino izolirane genomske DNA smo raztopili v pufru TE z RNA-zo.

### **3.2.7.2.2 Restrikcija izolirane genomske DNA**

Za pripravo 30 µl restriktivne mešanice smo v mikrocentrifugirko odpipetirali po 5 µl izolirane genomske DNA, 2 µl restriktivnega encima *PstI* (Fermentas), 3 µl ustrezne pufre za delovanje encima (Fermentas) in 20 µl sterilne destilirane vode. Restriktivne mešanice smo inkubirali preko noči v vodni kopeli ogreti na 37°C.

### **3.2.7.2.3 Elektroforeza razrezane genomske DNA**

V jamice 0,9-odstotnega gela smo vnesli DNA marker VI označen z digoxigeninom (Roche) in 10 µl razrezane genomske DNA naših vzorcev. Za pozitivno kontrolo pa smo uporabili razrezano genomsko DNA seva J53 pMG252 ter PCR pomnožek dela gena *qnrA*. Fragmente razrezane genomske DNA smo ločevali pri napetosti 10V/cm gela, približno eno do dve uri.

### **3.2.7.2.4 Kapilarni prenos fragmentov razrezane genomske DNA na nitrocelulozno membrano - »southern blotting«**

Pred kapilarnim prenosom razrezane DNA z gela na nitrocelulozno membrano smo gel inkubirali v seriji raztopin ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi:

- depuracijska raztopina, 10 minut,
- spiranje z destilirano vodo,
- denaturacijska raztopina, 30 minut (vmes raztopino zamenjamo s svežo),
- spiranje z destilirano vodo,
- nevtralizacijska raztopina, 30 minut (vmes raztopino zamenjamo s svežo),
- 20 X SSC prenosna raztopina, 10 minut,

Tako obdelan gel smo z zgornjo stranjo navzdol položili na primerno velik kos filtrirnega papirja Whatman 3MM. Papir smo postavili na stekleno ploščo, njegovi robovi pa so viseli v spodaj ležečo banjico z 20 X SSC pufrom. Na gel smo previdno položili primerno velik kos nitrocelulozne membrane in približno enako velik kos filtrirnega papirja. Kapilarni tok pufra skozi gel smo zagotovili tako, da smo na vrhu naložili še 15 cm visok stolpič iz vpojnih papirnatih brisač in vse skupaj obtežili. Na straneh smo z gospodinjsko folijo izolirali stolpič papirnatih brisač od spodaj ležečega 20 X SSC pufra. Naslednji dan smo nitrocelulozno membrano odstranili iz gela, jo 5 minut spirali v 2 X SSC prenosnem pufru in jo posušili na papirnati brisači. Suho smo položili med dva kosa filtrirnega papirja in jo položili v vakumsko peč na 80°C za dve uri.

### 3.2.7.3 Hibridizacija

#### 3.2.7.3.1 Predhibridizacija

Nitrocelulozno membrano z vezano vzorčno DNA smo položili v posodo s hibridizacijskim pufrom, ki smo ga segreli na 60°C. Membrano smo na rotacijski vodni kopeli ob rahlem stresanju inkubirali 1 uro. Nato smo pufer odlili.

#### 3.2.7.3.2 Hibridizacija

Pripravljeno DNA sondo smo denaturirali tako, da smo jo inkubirali 5 minut v vreli vodi, nato pa smo jo takoj prenesli v ledeno vodno kopel. Tako pripravljeno sondo smo dodali k hibridizacijskemu pufru, ki smo ga predhodno segreli na 60°C. Predhibridizirano membrano smo čez noč inkubirali v hibridizacijskem pufru z dodano DNA sondo pri 30 vrt./min in 60°C.

#### 3.2.7.3.3 Posthibridizacijska spiranja.

Po končani hibridizaciji smo vzeli membrano iz hibridizacijske raztopine in jo sprali:

- v pufru za spiranje I pri sobni temperaturi. Inkubirali smo jo deset minut z vmesno zamenjavo pufra,
- v pufru za spiranje II pri 60°C, Inkubirali smo jo pol ure, z vmesno zamenjavo pufra.

### 3.2.7.4 Imunološka detekcija vezane sonde

Membrano smo na kratko splagnili v pufru A ter jo pol ure inkubirali v sveže pripravljenem pufru B pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo pufer B odlili in k membrani dolili 20 ml pufra B z dodanimi konjugiranimi protitelesi  $B_{AB}$ . Po polurni inkubaciji pri sobni temperaturi smo nevezana protitelesa odstranili z dvakratnim spiranjem membrane v pufru A pri enakih pogojih kakor prej. Sledila je kratka inkubacija v 30 ml pufra C. Pufer C smo nato odlili in membrano inkubirali v pufru C<sub>CS</sub> v pokriti posodi in brez stresanja dokler se ni pojavil signal (približno dve uri). Ko se je pojavil signal smo reakcijo ustavili s spiranjem membrane v sterilni destilirani vodi.

## 3.2.8 Analiza plazmidov izoliranih iz transkonjugant

### 3.2.8.1 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, nato pa preverili učinkovitost obeh metod.

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 µl raztopine I. Suspenziji celic smo dodali 4 µl lizocima v vodi (50 mg/ml), narahlo premešali in inkubirali deset minut pri sobni temperaturi, da celice lizirajo. K lizatu smo najprej dodali 400 µl sveže pripravljene raztopine II, nato pa še 300 µl 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, in 4°C. Po ločitvi faz smo 800 µl zgornje vodne faze prenesli v svežo mikrocentrifugirko in ji dodali enako količino mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol. Zmes smo na kratko vorteksirali in ponovno 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 centrifugiraju smo alkohol odlili in odstranili s pipeto, oborini DNA pa dodali 1 ml 70-

odstotnega etanola. Centrifugirali smo deset minut pri enakih pogojih, nato pa etanol popolnoma odstranili z avtomatsko pipeto. Oborjeno plazmidno DNA smo sušili 20 minut, da je ves alkohol izhlapel, posušeno oborino pa raztopili v 30 µl pufra TE z RNA-zo. Prisotnost plazmidne DNA smo preverili z elektroforezo na 0,7-odstotnem agaroznem gelu, kot velikostni standard pa smo uporabili DNA plazmida pR388.

### 3.2.8.2 Popolna restrikcija izoliranih plazmidov in analiza vzorcev dobljenih fragmentov

Za pripravo 20 µl restriktivnih mešanic smo v mikrocentrifugirke odpipetirali po 15 µl izolirane plazmidne DNA, 1,5 µl restriktivskega encima *PstI* (Fermentas), 2 µl ustrezne pufre za delovanje encima (Fermentas) ter 1,5 µl deionizirane vode. Restriktivske mešanice smo dobro premešali in jih inkubirali preko noči v vodni kopeli segreti na 37°C. Restriktivske mešanice smo z nanašalnim pufrom (razmerje 20:1) nanesli na 1-odstotni agarozni elektroforeznii gel. Kot merilo velikosti smo uporabili 1-kb lestvico. Elektroforeza fragmentov je potekala približno deset ur pri 5V/cm gela v pufru 1 X TBE.

### 3.2.8.3 Primerjava učinkovitosti izolacije plazmida iz bakterij gojenih na trdnem in tekočem gojišču

Dva naključno izbrana seva transkonjugant smo nacepili na trdno gojišče in v tekoče gojišče z dodanim ampicilinom (100 µg/ml). Po prekonočni inkubaciji pri 37°C smo polno cepilno zanko bakterij s trdnega gojišča prenesli v mikrocentrifugirko, dodali 200 µl tekočega gojišča LB, resuspendirali ter centrifugirali 2 minuti pri 12.000 vrt./min v namizni centrifugi. Odstranili smo ves supernatant in stehtali mokro bakterijsko maso. 10 ml tekoče prekonočne kulture bakterij smo odpipetirali v 50 ml centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 9.000 vrt./min. Nato smo odstranili supernatant in stehtali usedlino bakterij.

Iz dobljenih bakterij smo nato izolirali plazmide po zgoraj opisanem postopku. Izolirano DNA smo vnesli v 0,7-odstotni agarozni elektroforezni gel. Kot standard smo uporabili DNA plazmida pR388. Elektroforeza je potekala dve uri pri 8V/cm gela.

### 3.2.9 Test za ugotavljanje klebicinov

Seve klebsiel z ESBL iz naše zbirke smo nacepili na trdna gojišča LB in jih inkubirali preko noči pri 37°C. V steklene petrijevke smo položili filtrirni papir, ki smo ga omočili z 1 ml kloroformom. Čez smo poveznili petrijevke trdnih gojišč LB z zraslimi bakterijami in jih za deset minut izpostavili hlapom kloroformom. Nato smo petrijevke z gojiščem odstranili s kloroformom in jih v digestoriju pustili odprta približno 20 minut, dokler ni ves kloroform izhlapel. Kot indikatorske seve smo uporabili *E. coli* DH5 in *E. coli* MC4100 ter seva klebsiel 933-2 in 2270 iz naše zbirke. Indikatorske seve smo nacepili v tekoče gojišče LB in jih inkubirali preko noči pri 37°C. 400 µl prekonočne kulture indikatorskih sevov smo odpipetirali v 4,5 ml mehkega agarja, ki smo ga predhodno ohladili v termobloku na 46°C. Mehki agar smo premešali in ga prelili na kloroformirane bakterijske kolonije testiranih sevov. Ko se je mehki agar strdil smo gojišča inkubirali preko noči pri 37°C, nato pa pregledali cone lize indikatorskih sevov. Vsak sev klebsiel smo testirali na prisotnost klebicinov s štirimi različnimi indikatorskimi sevi.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ZBIRKA UROPATOGENIH SEVOV KLEBSIEL Z ESBL

Pri delu smo uporabljali zbirko uropatogenih ESBL producirajočih sevov bakterij iz rodu *Klebsiella*. Seve so pridobili iz različnih zdravstvenih domov in domov starejših občanov v Ljubljani in okolici, urološke ambulante na polikliniki in bolnišnice Trbovlje. Identificirali so jih v Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) v Ljubljani. Na IVZ-ju so sevom z difuzijsko metodo z diskami določili rezistenco proti ciprofloxacinu (Cip), norfloxacinu (Nor) in proti sulfametoksazol-trimetoprimu (Sxt), po priporočilih Inštituta za klinične in laboratorijske standarde.

**Preglednica 6.** Razporeditev uropatogenih sevov klebsiel z ESBL po letih, vir sevov in rezistenca proti Cip, Nor in Sxt.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>št. stevilo sevov iz:</b>						
domovi starejših občanov (52)	11	8	4	8	11	10
bolnišnica Trbovlje (30)	2	0	4	9	7	8
urološka ambulanta (9)	1	1	3	2	2	0
zdravstveni domovi (12)	0	0	0	2	7	3
skupno število pacientov	8	3	6	20	20	17
<b>skupno število sevov (103)</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>21</b>
<b>št. (%) rezistentnih sevov</b>						
Cip rezistentni	7 (50)	4 (44)	7 (64)	19 (90)	27 (100)	18 (86)
Cip intermediarni	7 (50)	5 (56)	4 (36)	2 (10)	0 (0)	3 (14)
Nor rezistentni	7 (50)	2 (22)	6 (55)	19 (90)	26 (96)	18 (86)
Nor intermediarni	0 (0)	3 (34)	4 (36)	2 (10)	0 (0)	1 (5)
Nor občutljivi	7 (50)	4 (44)	1 (9)	0 (0)	1 (4)	2 (9)
Sxt rezistentni	13 (93)	7 (78)	11 (100)	19 (90)	27 (100)	16 (76)
Sxt občutljivi	1 (7)	2 (22)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	5 (24)

**Preglednica 7.** Število (%) proti Cip, Nor in Sxt rezistentnih, intermediarnih in občutljivih sevov v celotni zbirki

	<b>rezistentni</b>	<b>intermediarni</b>	<b>občutljivi</b>
<b>Cip</b>	82 (79,6)	21 (20,4)	0 (0,0)
<b>Nor</b>	78 (75,7)	10 (9,7)	15 (14,6)
<b>Sxt</b>	93 (90,3)	0 (0,0)	10 (9,7)

#### 4.2 ANALIZA UROPATOGENIH SEVOV KLEBSIEL Z ESBL

Pri vseh uropatogenih sevih klebsiel z ESBL iz zbirke smo s PCR in s hibridizacijo preverili prisotnost zapisov za gene *qnr*. S PCR smo preverili prisotnost integronov, ki smo jih z restrikcijsko analizo razdelili v družine. S konjugacijo in selekcijo na gojiščih z različnimi antibiotiki smo preverili prisotnost konjugativnih plazmidov z rezistenco proti kinolonom. Preverili smo tudi prisotnost klebicinov ter na podlagi teh rezultatov skušali seve tipizirati. Rezultati so povzeti v preglednici 8 ter obrazloženi v sledečih poglavjih.

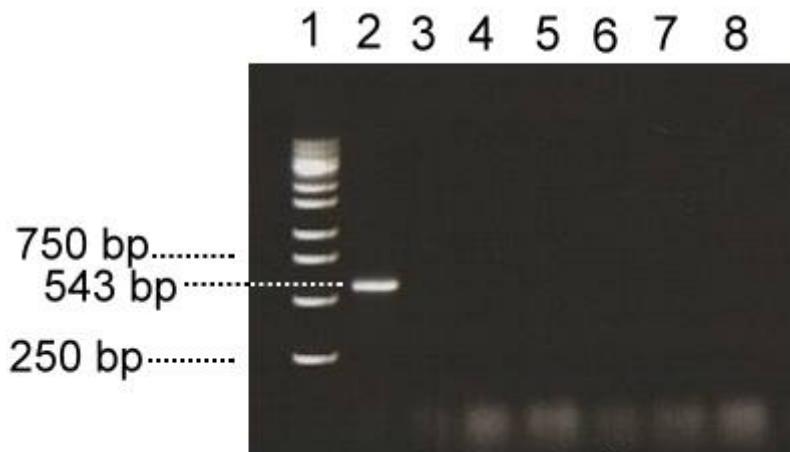
**Preglednica 8.** Rezultati analize sevov klebsiel z ESBL. Prenos rezistence proti ciprofloksacinu in norflaksacinu pri uropatogenih sevih klebsiel z ESBL (primarna selekcija – kombinacija protimikrobnih spojin, s katerima smo odbrali primarne konjugante, Ap - ampicilin, Az – natrijev azid Cip - ciprofloksacin (koncentracija 0,06 µg/ml), Cm - kloramfenikol, Nor – norfloksacin (koncentracija 0,1 µg/ml), Tc - tetraciklin, Tp - trimetoprim; (+) - rast, (-) - ni rasti. Odtis na gojišče s CipAz in NorAz – poleg znaka za pozitivno rast je v nadpisanim tekstu napisano na katerem gojišču smo primarno selekcionirali transkonjuganto, ki je po odtisu zrasla. Sevi, pri katerih je prišlo do prenosa rezistence proti Nor in Cip so osenčeni. Integrone - v tabeli so podani rezultati reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti delov genov za integrizo integrone - označena je integronska družina. (/)- integrone nismo zasledili. Rezultati restriktijske analize PCR pomnožka gena za aminoglikozid acetiltransferazo: divji tip je *aac(6')-Ib* oblika, mutirana oblika pa *aac(6')-Ib-cr*. S + ali – je označena prisotnost posameznih variant. Rast na gojiščih s kanamicinom (Kn): (+) - rast, (-) - ni rasti.

oznaka seva rodu <i>Klebsiella</i>	primarna selekcija				odtis na gojišče s CipAz in NorAz	integroni	prisotnost aminoglikozid - acetiltransferaze		rast na Kn gojiščih
	ApAz	TcAz	TpAz	CmAz			divji tip	mutirana oblika	
<b>Leto2000</b>									
657-1	+	-	+	-	-	IntI1	+	-	+
666-2	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
666-3	+	-	-	-	-	/	+	-	+
777-1	+	+	+	+	-	IntI1	-	-	+
992-1	+	-	+	+	-	IntI1	-	-	+
992-2	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
1875	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
2270	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
2665-1	+	-	+	-	-	IntI1	+	-	+
2778-3	+	-	-	-	-	IntI1	-	-	+
3319-1	+	-	-	+	-	IntI1	+	-	+
4168-1	+	+	+	-	-	IntI1	+	-	+
4877-1	+	-	+	-	-	IntI1	-	-	+
4877-2	+	-	-	-	-	/	+	-	+
<b>Leto2001</b>									
758-1	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
1361-1	+	+	-	+	+ cm	IntI1	+	+	+
2694-2	+	+	+	+	-	IntI1	-	-	+
2694-3	+	+	-	-	-	IntI1	+	-	+
3160-1	+	-	-	+	-	/	+	-	+
3160-3	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
3160-4	+	-	-	+	-	/	+	-	+
3447-1	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
4539-1	+	-	-	-	-	/	+	-	+
<b>Leto2002</b>									
424-1	+	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
442-1	+	+	+	-	-	IntI1	+	-	+
442-2	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
2430-1	+	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
2513-1	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
2538-1	+	+	-	+	-	IntI1	+	-	+
2766-1	+	+	-	-	-	IntI1	+	-	+
3585	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
4107-1	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
4309-2	-	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
4888-3	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
<b>Leto2003</b>									
1004-1	+	-	-	-	-	/	+	-	-
1485-2	+	-	-	-	-	/	+	-	+
1735-1	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
2237-1	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	+	+	+
2550-2	+	-	-	-	+ amp	IntI1	-	+	+
2992	+	-	+	-	-	IntI1	-	-	-
3090-1	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+

3117-1	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
3366-2	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
3759-1	+	+	-	-	-	/	+	-	+
3745-2	-	-	-	-	-	IntI1	-	-	+
3945-2	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
3946-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
3951-3	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
4212-2	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
4239-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
4319-1	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
4432-2	+	+	+	-	+ amp,tc,tp	IntI1	-	+	+
4700	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
4743-1	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
4801-2	-	-	+	-	-	IntI1	-	+	+
<b>Leto2004</b>									
189-1	+	+	+	-	-	IntI1	-	-	-
269-1	+	+	+	-	-	IntI1	-	-	-
359-4	+	-	+	-	+ amp	IntI1	-	+	+
488-1	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
514-1	+	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
672-1	+	-	-	-	+ amp	IntI1	-	+	+
779	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
731-1	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
1073-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
1238-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
1275-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
1431-2	-	+	+	+	-	IntI1	-	-	+
1449-2	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
1715-2	+	+	+	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
1765-1	-	-	-	-	-	IntI1	-	+	+
1968-1	-	-	-	-	-	IntI1	-	+	+
2057-1	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
2108-1	-	+	+	-	+ tc	IntI1	-	+	+
2174-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
2425-1	-	-	+	-	-	IntI1	+	-	+
2897-1	+	-	+	-	+ amp	/	-	+	+
3170-2	-	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
4766	+	-	-	-	-	/	+	+	+
4703-2	+	+	+	-	+ amp	IntI1	-	+	+
4703	+	-	+	-	-	IntI1	-	-	-
4755-3	-	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
4718	+	-	-	-	-	IntI1	+	-	-
<b>Leto2005</b>									
603-1	-	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
912-1	+	+	+	-	-	IntI1	+	-	+
933-2	-	-	-	-	-	IntI1	-	+	+
1093	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
966-1	-	-	-	-	-	IntI1	-	+	+
181-1	+	+	+	-	+ amp,tc,tp	IntI1	-	+	+
1222-1	+	-	-	-	-	/	-	-	+
1222-3	+	-	-	-	-	/	+	-	+
4496	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
102	+	-	-	-	-	IntI1	+	+	+
190	+	-	+	+	-	IntI1	+	-	+
445-1	+	-	-	-	-	/	-	+	+
806-3	+	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
788-1	+	+	-	-	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
1182-2	+	-	-	-	-	IntI1	+	-	+
1594-2	+	+	+	-	-	IntI1	+	-	+
1981	+	-	-	+	+ amp,tp	IntI1	-	+	+
2560-1	+	+	+	+	-	IntI1	+	-	+
4750-1	+	-	-	+	+ amp,tc	IntI1	-	+	+
1908-1	+	+	+	-	-	IntI1	+	+	+
2042-2	+	-	+	+	-	IntI1	-	+	+

#### 4.2.1 Ugotavljanje prisotnosti genov *qnr* s PCR

Prisotnost delov genov z zapisom za rezistenco proti kinolonom *qnrA*, *qnrS* in *qnrB* pri vseh iz zbirke smo preverili z metodo PCR, ki je opisana v razdelku o materialih in metodah. Produkte reakcije smo vnesli v 1-odstotni agarozni elektroforezni gel, ki smo ga prestvetlili z UV-svetlobo pri valovni dolžini 302 nm in slikali.

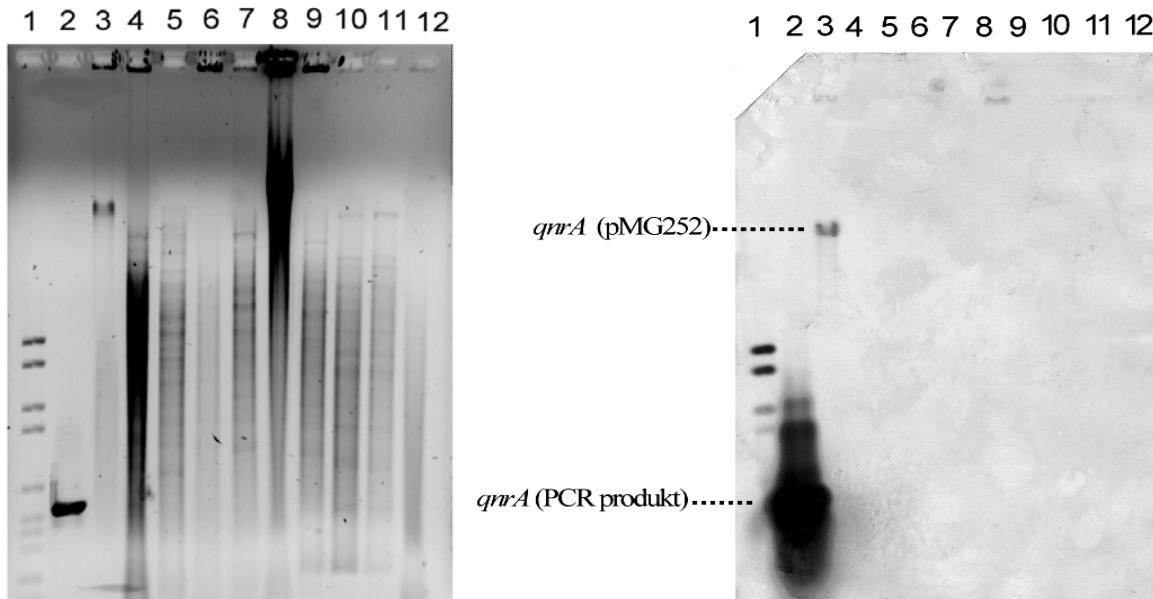


**Slika 3.** Primer elektroforeze PCR pomnožkov dela zapisa za rezistenco proti kinolonom *qnrA* (1- 1 kb lestvica, 2- pozitivna kontrola, 3 do 8 – sevi *Klebsiella* sp. : 2270, 4168-1, 3160-4, 1361-1, 4877-2, 666-2)

Prisotnost delov qenov *qnrA*, *qnrS* in *qnrB* smo preverjali pri vseh 103 sevih klebsiel. Zapisa za QnrA, QnrS ali QnrB nismo našli pri nobenem od sevov iz zbirke.

#### 4.2.2 Ugotavljanje prisotnosti determinante *qnr* s hibridizacijo

S hibridizacijo smo preverjali prisotnost gena *qnrA*, ali morebitne rahlo spremenjene različice tega gena. Za sondu smo uporabili z DIG-dUTP-jem označen PCR pomnožek gena *qnrA*, pogoje spiranja pa smo prilagodili tako, da smo omogočili hibridizacijo sonde na DNA vzorcev, ki niso popolnoma komplementarni. Genomsko DNA sevov klebsiel iz zbirke smo razrezali z encimom *PstI*, ki v genih *qnrA*, *qnrS* in *qnrB* nima razpoznavnih zaporedij. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili PCR pomnožek gena *qnrA* in genomsko DNA seva *E. coli*/pMG252. Hibridizacijo smo izvedli po postopku, ki je opisan v razdelku o materialih in metodah.



**Slika 4.** Ugotavljanje prisotnosti genov *qnr* pri zbirki klebsiel s hibridizacijo: na levi je slika z encimom *PstI* razrezane genomske DNA pred prenosom na nitrocelulozno membrano, na desni pa je slika membrane po hibridizaciji in detekciji z digoksiginenom. 1-DNA velikostni standard ounačen z digoxigeninom (Roche), 2-PCR pomnožek dela gena *qnrA* pomnožen iz plazmida pMG252, 3 – sev *E. coli* J53/pMG252, 4 do 12 si po vrsti sledijo sevi *Klebsiella* sp.: 1765-1, 1073-1, 1449-2, 1715-2, 779, 731-1, 672-1, 603-1 in 4718.

Prisotnost delov genov *qnr* smo ugotavljali pri vseh 103 sevih klebsiel iz zbirke. Metodo smo uspešno izvedli, saj je bil signal pri pozitivnih kontrolah močan. Vsi testirani sevi so bili na prisotnost gena *qnrA* ali minimalno spremenjene različice negativni.

#### 4.2.3 Konjugacija klebsiel z ESBL

##### 4.2.3.1 Primarna konjugacija klebsiel z ESBL s sevom *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>

Primarni prenos konjugativnih plazmidov z zapisi za rezistenco proti kinolonom smo izvedli s konjugacijo, ki je opisana v razdelku o materialih in metodah. Kot donorje smo uporabili seve klebsiel z ESBL iz naše zbirke, recipient pa je bil v vseh primerih sev *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>.

Konjugante smo odbrali z gojenjem na selektivnih gojiščih s kombinacijo dveh učinkovin: natrijevega azida in ampicilina, tetraciklina, trimetoprima ali pa kloramfenikola. Natrijev azid smo uporabili kot protiselekcijo proti donorju, ostale antibiotike pa za selekcijo primarnih konjugant s prenešenimi plazmidi. Ko smo konjugante odbrali na selektivnih gojiščih, smo jih odtisnili na trdna gojišča z natrijevim azidom in ciprofloksacinom (0,06 µg/ml) ter natrijevim azidom in norfloksacinom (0,1 µg/ml). Plošče smo inkubirali 30 ur pri 37°C in zabeležili rast. Rezultati primarnih konjugacij so prikazani v preglednici 8.

Rezistenca proti ciprofloksacinu in norfloksacinu se je s konjugativnim plazmidom prenesla pri 27 (26-odstotkih) od 103 sevov. V vseh primerih se je rezistenca proti ciprofloksacinu in norfloksacinu prenesla hkrati. Skupaj z rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu se je na konjugativnem plazmidu najpogosteje prenesla še rezistenca proti ampicilinu (v 93-odstotkih), sledijo ji rezistenca proti tetraciklinu (v 74-odstotkih), rezistenca proti trimetoprimu (v 11-odstotkih) in rezistenca proti kloramfenikolu (v 3-odstotkih).

#### 4.2.3.2 Sekundarna konjugacija klebsiel z ESBL s sevom *E. coli* RU4404 Cm<sup>r</sup>

Štiri primarne transkonjugante, pri katerih se je prenesel zapis za rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu smo uporabili kot donorje, laboratorijski sev *E. coli* RU4404 Cm<sup>r</sup> pa kot recipient. Pri sekundarni konjugaciji smo izbrali primarne transkonjugante, pri katerih se je skupaj z rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu na plazmidu prenesla še rezistenca proti ampicilinu in tetraciklinu. Sekundarni prenos konjugativnega plazmida smo izvedli na enak način kot primarnega, ki je opisan v razdelku o materialih in metodah.

Sekundarne transkonjugante smo odbrali na trdih gojiščih z LB s tremi antibiotiki: z ampicilinom in tetraciklinom za selekcijo transkonjugant in s kloramfenikolom za protiselekcijo donorja. Na seleksijskem gojišču so zrasle vse sekundarne transkonjugante. Posamezne kolonije smo prepikirali z zobotrebcem in jih naslednji dan prek sterilne krpe odtisnili na trdno gojišče z natrijevim azidom in ciprofloksacinom (0,06 µg/ml) ter natrijevim azidom in norfloksacinom (0,1 µg/ml). Pri sekundarni transkonjuganti donorskoga seva 4432-2 je bila kontrola pozitivna, zato smo jo izločili iz poskusa.

Pri treh preostalih primarnih transkonjugantah (donorskih sevov: 1449-2, 731-1, 3951-3) je sekundarna konjugacija uspela. Zapis za rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu se je ponovno prenesel.

#### 4.2.4 Ugotavljanje prisotnosti alela *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr*, ki kodirata divjo in mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze, pri sevih klebsiel z ESBL

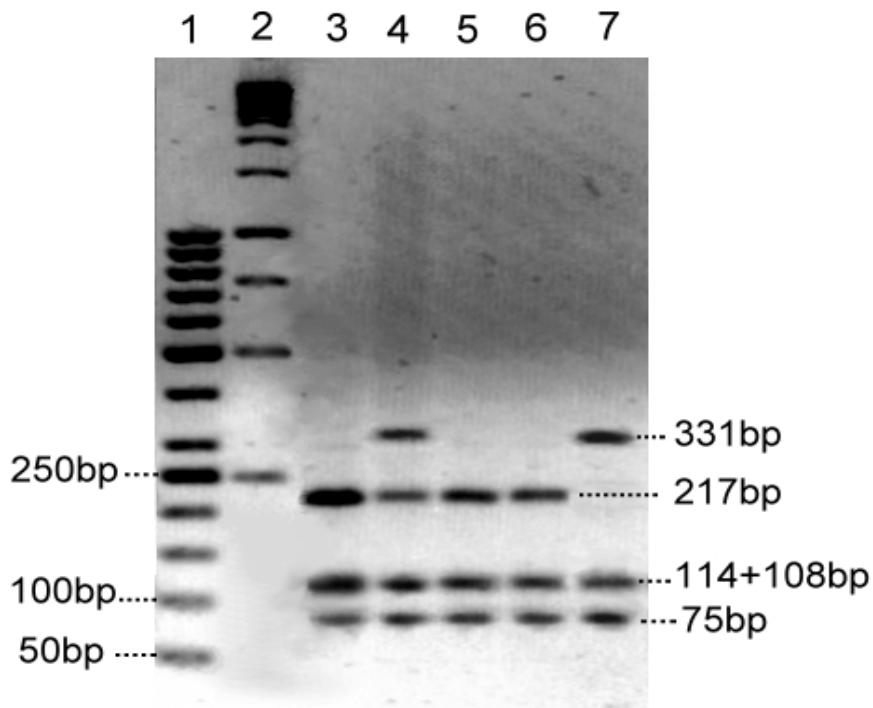
Pri vseh sevih klebsiel iz zbirke smo s parom začetnih oligonukleotidov qac1/qac2 pomnožili del gena za encim aminoglikozid acetiltransferazo. Nastali 514 bp velik PCR pomnožek je del nemutiranega alela *aac(6')-Ib*, kot tudi mutirane različice *aac(6')-Ib-cr*, ki posreduje rezistenco proti kinolonom. PCR pomnožek smo v ločenih restrikcijah razrezali z encimoma *TaaI* in *NdeI*, nato pa nastale fragmente ločili z elektroforezo na 2-odstotnem agaroznem gelu, ki smo ga presvetlili z UV-svetlobo pri valovni dolžini 302 nm in nato slikali. Prisotnost mutirane različice *aac(6')-Ib-cr* smo dodatno potrdili s specifičnim parom začetnih oligonukleotidov pIKREco/pIKFEco. Natančen postopek je opisan v razdelku o materialih in metodah.

**Preglednica 9:** 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

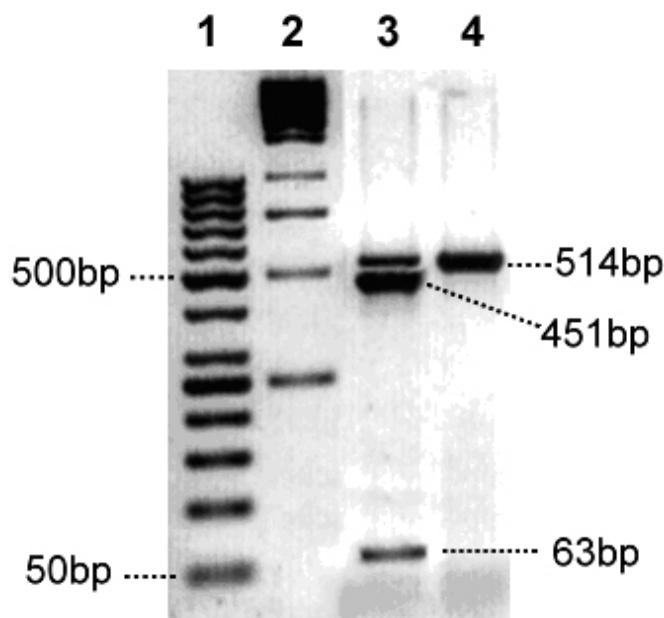
	restrikcija s <i>TaaI</i> (velikost fragmentov v bp)	restrikcija z <i>NdeI</i> (velikost fragmentov v bp)
<i>alel aac (6')-Ib</i>	108 331 75	514
<i>alel aac (6')-Ib-cr</i>	108+114 217 75	451 63

Glede na velikost nastalih fragmentov po restrikciji PCR pomnožka z encimoma *TaaI* in *NdeI*, ki je prikazana v tabeli 9, smo določili če je v PCR pomnožku alel *aac(6')-Ib* in/ali alel *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 (slika 5). 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 (slika 6). Prisotnost obeh alelov gena za aminoglikozid acetiltransferazo pri posameznih sevih klebsiel je prikazana v preglednici 8.



**Slika 5.** Primer restriktijske analize fragmentov pri nekaterih sevih klebsiel z ESBL, izoliranih v letu 2004 po restrikciji z encimom *TaaI*. Na sliki so predstavljeni primeri, ko ima sev le mutirano obliko aminoglikozid acetiltransferaze (3), ko ima obe oblike (4) in ko ima le alel divjega tipa (7) 1-50bp lestvica, 2-1kb lestvica, 3 - sev 1765-1, 4 -sev 4755-3, 5-sev 1968-1, 6 -sev 1715-2, 7 -sev 2425-1



**Slika 6.** Primer restriktijske analize fragmentov pri nekaterih sevih klebsiel z ESBL izoliranih v letu 2004 po restriktiji z encimom *NdeI*. Na sliki je predstavljen primer ko sev vsebuje mutiran in nemutiran alel gena za aminoglikozid acetiltransferazo (3) ter primer ko sev vsebuje le nemutiran alel (4) 1-50bp lestvica, 2-1kb lestvica, 4 -sev 4755-3, 7 -sev 2425-1

**Preglednica 10.** Prisotnost divjega tipa gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib* in mutirane različice *aac(6')-Ib-cr* pri sevih klebsiel z ESBL po posameznih letih. V tabeli so poleg števila sevov navedeni še odstotki v oklepajih.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
skupno število sevov	14	9	11	21	27	21
le divji tip alela	9 (64,3)	7 (77,7)	11 (100)	4 (19)	5 (18,5)	9 (42,8)
le mutiran alel	/ (0,0)	/ (0,0)	/ (0,0)	10 (47,6)	13 (48,1)	10 (47,6)
oba alela hkrati	1 (7,1)	1 (14,3)	/ (0,0)	5 (23,8)	5 (18,5)	2 (9,5)
alel ni prisoten	4 (28,6)	1 (14,3)	/ (0,0)	2 (9,5)	4 (14,8)	1 (4,7)

Zapis za alel *aac(6')-Ib-cr* smo odkrili pri 32-odstotkih sevov iz zbirke, zapis za alel divjega tipa pri 43,7-odstotkih sevov, pri 13,6-odstotkih sevov pa smo odkrili oba alela. Prisotnost mutiranega alela smo v vseh primerih dodatno potrdili v PCR reakciji, s parom začetnih oligonukleotidov pIKREco/pIKFEco.

#### 4.2.5 Ugotavljanje prisotnosti integronov posameznih razredov pri sevih klebsiel z ESBL

Pri vseh sevih klebsiel z ESBL iz zbirke smo z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi hep35/hep36 pomnožili del genov za integrazo integronov. Dobljene PCR pomnožke smo ločeno razrezali z encimoma *RsaI* in *HinfI*, restrikcijske mešanice vnesli v 2-odstotni agarozni elektroforezni gel in fragmente nastale po restrikciji ločili z elektroforezo. Gel smo nato presvetlili z UV-svetlobo pri valovni dolžini 302 nm in ga slikali. Natančnejši postopek je opisan v razdelku o materialih in metodah. Glede na število in velikost fragmentov po restrikciji z *RsaI* in *HinfI* smo dele genov za integrazo pripisali integronom iz posameznih razredov. Način razvrstitev je podan v preglednici 11. V preglednici 8 je prikazana prisotnost integronov pri posameznih sevih klebsiel.

**Preglednica 11:** Velikost fragmentov nastalih po restrikciji PCR pomnožkov dobljenih s parom degeneriranih začetnih oligonukleotidov hep35/hep36 in razrezanih z encimoma *RsaI* ali *HinfI*

PCR pomnožek	encim	število fragmentov	velikost fragmento (bp)
<i>intI1</i>	<i>RsaI</i>	1	491
	<i>HinfI</i>	1	491
<i>intI2</i>	<i>RsaI</i>	2	334, 157
	<i>HinfI</i>	2	300, 191
<i>intI3</i>	<i>RsaI</i>	3	97, 104, 290
	<i>HinfI</i>	2	119, 372

S PCR smo pomnožili del zapisa za integrazo integronov pri 90 (87,4-odstotkov) od 103 sevov. Vse PCR pomnožke smo na podlagi dobljenih fragmentov nastalih po restrikciji z izbranima encimoma pripisali integronom iz 1. razreda.. Odstotki integronov posamezno po letih od 2000-2006 so sledeči : 85, 66, 100, 85, 92 in 86-odstotkov..

#### 4.3 ANALIZA TRANSKONJUGANT

Pri 27 donorskih sevih iz zbirke klebsiel z ESBL smo s konjugacijo uspeli prenesti zapis, ki posreduje rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu. Transkonjugante smo označili z oznako TK in številkami od 1 do 27. Z Etesti smo ugotovili minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin, ter jih primerjali z donorskimi sevi. Pri transkonjugantah smo ponovno preverili prisotnost zapisa za obe različici aminoglikozid acetiltransferaze. Izolirali smo plazmidno DNA in jo razrezali z encimom *PstI*. Nastale fragmente smo ločili z elektroforezo in glede na vzorec fragmentov plazmide uvrstili v različne skupine. Rezultati analize transkonjugant so povzeti v preglednici 12 ter natančneje obrazloženi v sledečih poglavjih.

**Preglednica 12:** Rezultati analize transkonjugant: navedeno je leto izolacije donorskega seva, oznaka donorskega seva in ustanova v kateri je bil donorski sev izoliran (urolog-urološka ambulanta na polikliniki v ljubljani, Dso ko - Dom starejših občanov Kolezija, BT-bolnišnica Trbovlje, ZD Litij- Zdravstveni dom Litija, Zd Šiš- Zdravstveni dom Šiška). Z oznako + (prisoten) ali – (ni prisoten) je označena prisotnost alela divjega tipa *aac(6')-Ib* in mutirane različice alela *aac(6')-Ib-cr* gena za aminoglikozid acetiltransferazo. Rast na gojiščih s kanamicinom (Kn): (+)-raste, (-)-ne raste. Uvrstitev plazmida glede na restriktijski vzorec v posamezni razred (1, 2a, 2b, 2c) je označena z znakom X.

leto	vir	donorski sev	oznaka trans-konjugante	aminoglikozid acetiltransfaza		rast na Kn gojiščih	plazmidni razred			
				divji tip	mutirana oblika		1	2a	2b	2c
2001	urolog	1361-1	TK1	-	+	+				X
2003	Dso Ko	2237-1	TK2	-	+	+				X
	BT	2550-2	TK3	-	+	+				X
	BT	3090-1	TK4	-	+	+	X			
	BT	3117-1	TK5	-	+	+				X
	BT	3366-2	TK6	-	+	+				X
	BT	3951-3	TK7	-	+	+				X
	Dso Ko	4319-1	TK8	-	+	+	X			
	Dso Ko	4432-2	TK9	-	+	+				X
	BT	4700	TK10	-	+	+				X
	BT	4743-1	TK11	-	+	+	X			
2004	ZD Lit	359-4	TK12	-	+	+	X			
	BT	488-1	TK13	-	+	+				X
	Zd Lit	672-1	TK14	-	+	+	X			
	Dso Ko	779	TK15	-	+	+				X
	BT	731-1	TK16	-	+	+				X
	Dso Ko	1449-2	TK17	-	+	+				X
	Dso Ko	1715-2	TK18	-	+	+				X
	Dso Ko	2057-1	TK19	-	+	+	X			
	BT	2108-1	TK20	-	+	+				X
	Urolog	2897-1	TK21	-	+	+	X			
2005	Zd Šiš	4703-2	TK22	-	+	+				X
	BT	788-1	TK23	-	+	+				X
	BT	1093	TK24	-	+	+				X
	BT	1181-1	TK25	-	+	+				X
	BT	1981	TK26	-	+	+				X
	Zd Šiš	4750-1	TK27	-	+	+				X

#### 4.3.1 Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri primarnih transkonjugantah, njihovih donorjih in recipientu.

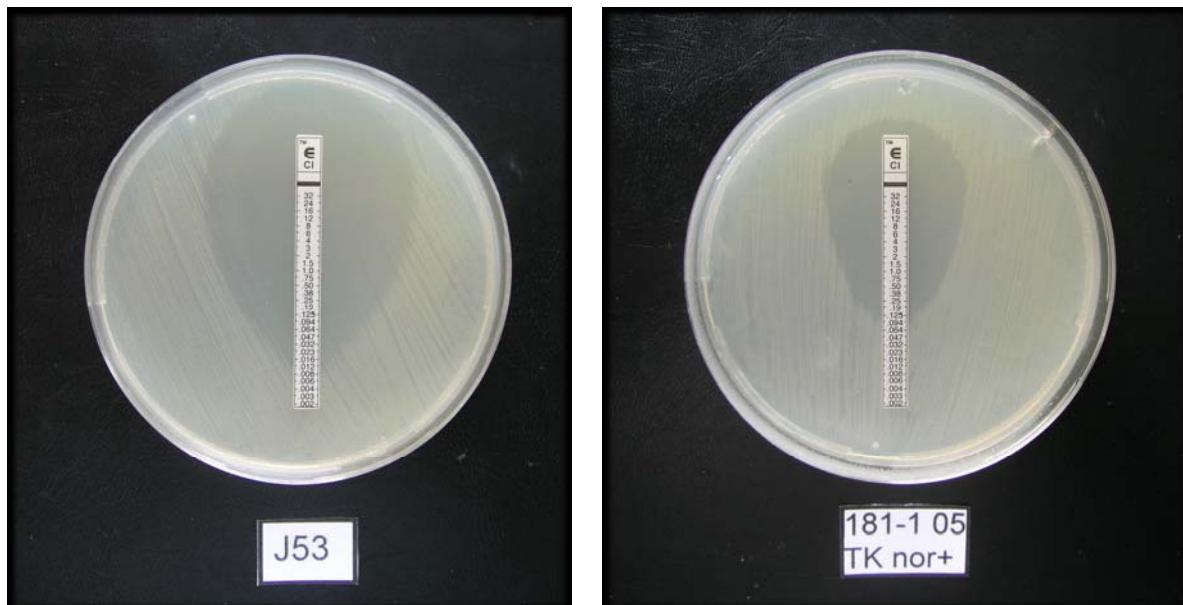
Izbranim sevom klebsiel z ESBL, njihovim primarnim transkonjugantam, recipientskemu sevu *E. coli* J53 in sevu *E. coli* J53/pMG252 smo določili minimalne inhibitorne koncentracije za antibiotik ciprofloksacin z difuzijsko metodo Etest, ki je opisana v razdelku o materialih in metodah. Kot kontrolo smo uporabili primarni transkonjuganti s konjugativnim plazmidom, ki ne posreduje rezistence proti ciprofloksacinnu.

**Preglednica 13:** Minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin pri izbranih donorskih sevih klebsiel z ESBL, njihovih primarnih transkonjugantah (TK), sevu *E. coli* J53 in J53/pMG252, določene z Etestom. TK Nor, Cip – kontrolna transkonjuganta, ki smo jo odbrali na drugih selektivnih gojiščih kot TK in po odtisu na norfloksacin in ciprofloksacin ni zrastla.

oznaka seva	MIK (µg/ml)	oznaka seva	MIK (µg/ml)
1361-1	4	1449-2	>32
TK1	0,094	TK17	0,094
3090-1	>32	2057-1	>32
TK4	0,016	TK19	0,125
4432-2	>32	2108-1	>32
TK9	0,125	TK20	0,094
4700	>32	1093	>32
TK10	0,125	TK24	0,125
4743-1	>32	1181-1	>32
TK11	0,064	TK25	0,125
359-4	>32	4319-1	>32
TK12	0,064	TK8	0,125
488-1	>32	TK8 Nor,Cip -	0,008
TK13	0,094	3366-2	>32
779	>32	TK6	0,064
TK15	0,125	TK6 Nor, Cip -	0,008
731-1	>32	J53	0,008
TK16	0,094	J53/pMG252	0,38

Pri skoraj nobenem od testiranih donorskih sevov nismo opazili cone inhibicije rasti bakterij okrog trakca prepojenega z gradientom koncentracije ciprofloksacina. Po navodilih proizvajalca smo določili, da je MIK teh sevov višja od 32 µg/ml. Le pri sevu 1361-1 smo odčitali nižjo MIK in sicer 4 µg/ml. Pri primarnih konjugacijah sevov 3366-2 in 4319-1 smo pridobili tudi transkonjugante, s konjugativnim plazmidom brez zapisa za rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu. Te smo odbrali na gojiščih z drugimi antibiotiki kot tiste, ki so po odtisu na plošče z Nor in Cip zrasle. Transkonjugante, ki nimajo zapisa za rezistenco proti ciprofloksacinu in norfloksacinu smo uporabili kot negativno kontrolo. MIK teh transkonjugant je bila enaka kot pri recipientskem sevu *E. coli* J53. Plazmid pMG252 z zapisom za QnrA poviša rezistenco seva J53 za 47-krat.

Pri primarnih transkonjugantah sedmih sevov se je MIK glede na recipientski sev (0,008 µg/ml) povišala za 16-krat. (0,125 µg/ml ). Pri petih transkonjugantah se je MIK zvišala za 12-krat ( 0,094 µg/ml), pri treh za 8-krat (0,064 µg/ml) in pri eni transkonjuganti le za dvakrat (0,016 µg/ml).



**Slika 7.** Primera difuzijske metode Etest, s katero smo ugotavljali MIK za ciprofloksacin. Levo je MIK recipientskega seva *E. coli* J53, desno pa MIK primarne transkonjugante seva 181-1.

#### **4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti divjega in mutiranega tipa aminoglikozid acetiltransferaznega gena pri primarnih transkonjugantah**

Prisotnost zapisa za divji tip in mutirano različico gena za aminoglikozid acetiltransferazo smo preverili pri vseh 27 transkonjugantah. Pripravili smo lizate prekonočnih kultur vseh transkonjugant in seva J53 Az<sup>r</sup>, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo, saj smo želeli preveriti prisotnost genov na konjugativnih plazmidih, recipientski sev pa teh genov ne sme imeti. Iz lizatov smo s PCR pomnožili 514 bp velik del gena za aminoglikozid acetiltransferazo, ki smo ga rezali v ločenih restrikcijah z encimoma *TaaI* in *NdeI*. Postopek je natančno opisan v razdelku o materialih in metodah. Rezultate, ki so predstavljeni v preglednici 12 smo analizirali glede na preglednico 9. Prisotnost obeh alelov gena za aminoglikozid acetiltransferazo smo dokazovali po enakem postopku kot pri donorskih sevih. Prisotnost mutiranega alela smo v vseh primerih dodatno potrdili v PCR reakciji, s parom začetnih oligonukleotidov pIKREco/pIKFEco.

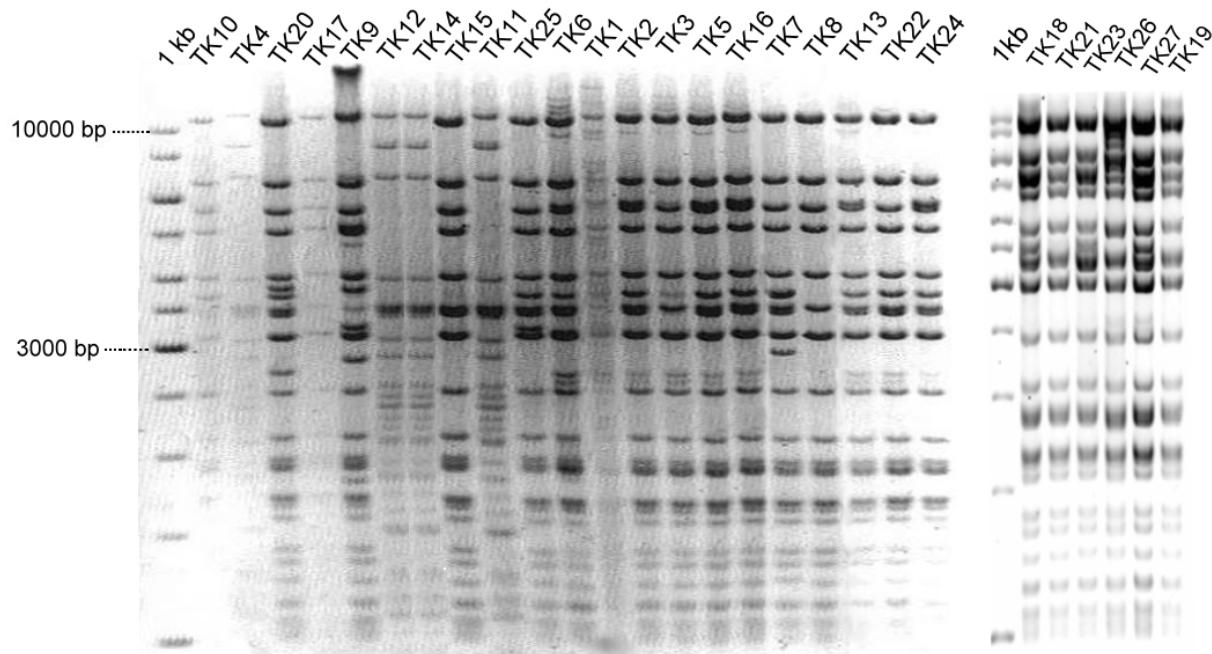
Pri vseh transkonjugantah je prisotna le mutirana različica gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib-cr*. Divji tip gena ni prisoten pri nobeni od transkonjugant. Recipientski sev J53 Az<sup>r</sup> nima nobene različice gena.

#### **4.3.3 Ugotavljanje odpornosti proti kanamicinu**

Transkonjugante in donorske seve klebsiel smo nacepili na trdna gojišča LB z dodanim kanamicinom v koncentraciji 30µg/ml. Po prekonočni inkubaciji smo preverili rast na gojišču. Donorski sevi pri vseh transkonjugantah so proti kanamicinu rezistentni. Tudi vse transkonjugante so na gojišču z dodanim kanamicinom zrastle, zato smo jih označili za proti kanamicinu odporne.

#### **4.3.4 Restriktivski profil plazmidov izoliranih iz transkonjugant**

Iz vseh 27 transkonjugant smo z alkalno hidrolizo po prirejenem postopku izolirali plazmidno DNA. Nato smo jo razrezali z encimom *PstI*. Postopek izolacije in restriktivne analize je podrobno opisan v razdelku o materialih in metodah. Restriktivne mešanice smo vnesli v jamice 1-odstotnega agaroznega gela, fragmente ločevali približno 20 ur pri 3 V/cm gela.



**Slika 8.** Restriktijski profil plazmidov vseh 27 transkonjugant po restrikciji z encimom *PstI*. Transkonjugante so označene enako kot v preglednici 13. 1kb - 1 kb lestvica.

Po analizi fragmentov restriktijskega profila plazmidov vseh 27 transkonjugant smo ugotovili 12 različnih restriktijskih vzorcev, ki smo jih razdelili v skupini 1 in 2, pri katerih se velikosti večine fragmentov med seboj razlikujejo. Plazmidi v skupini 1 imajo enak restriktijski profil, plazmide iz skupine 2 pa smo razdelili na tri podskupine; 2a, 2b in 2c. Pri plazmidih iz skupine 2 je večina nastalih fragmentov enake velikosti, razlikujejo se le v velikosti pri manjšem številu fragmentov. Znotraj podkupin 2a in 2b je vzorec fragmentov popolnoma enak, podskupina 2c pa združuje vse ostale primere transkonjugant, pri katerih se vzorec fragmentov razlikuje minimalno to je največ v 4 fragmentih.

#### 4.3.4.1 Primerjava učinkovitosti izolacije plazmida po standardnem in prirejenem postopku alkalne lize.

Ker smo pri izdelavi restriktivskega profila plazmide izolirali po prirejenem postopku alkalne hidrolize, smo primerjali učinkovitost izolacije s standardnim in prirejenim postopkom. V standardnem postopku se za izhodni material uporablja tekoča kultura, v prirejenem pa kultura iz trdnega gojišča. Na začetku smo stehiali mokro težo bakterij iz trdega in tekočega gojišča, iz katerih smo nato izolirali plazmide po natanko enakem postopku. Postopek je opisan v razdelku o materialih in metodah.

Povprečna mokra teža bakterij iz tekočega gojišča je 30 mg, mokra teža bakterij iz trdnega gojišča pa je 75 mg. V primeru trdnega gojišča smo v nadaljnem postopku izolacije uporabljali 2,5-krat večjo količino bakterij. Po izolaciji smo primerjali količino plazmidne DNA izolirane po obeh metodah na agaroznem elektroforeznem gelu. Količina plazmidne DNA glede na izhodno maso bakterij, je v obeh primerih izolacij približno enaka.

#### 4.3.5 Tipizacija sevov klebsiel z ESBL na podlagi izločanja klebicinov

Seve klebsiel z ESBL iz naše zbirke smo poskušali tipizirati na podlagi izločanja klebicinov. Indikatorski sevi, ki so jih uporabljali drugi raziskovalci nam niso bili dostopni, zato smo za indikatorske seve uporabili seva *E. coli* DH5, in *E. coli* MC4100 ter seva *Klebsiella sp.* 2270 in 933-2. Slednja dva sta seva iz naše zbirke, ki se fenotipsko med seboj razlikujeta, različna pa sta tudi od ostalih sevov v zbirk. Pri sevu 2270 smo s konjugacijo uspeli prenesti rezistenco proti ampicilinu, tetraciklinu, trimetoprimu in kloramfenikolu. Sev 933-2 pa je na vse te štiri antibiotike občutljiv. Vse seve klebsiel z ESBL iz naše zbirke smo testirali s štirimi indikatorskimi sevi po postopku, ki je opisan v razdelku o materialih in metodah. Prisotnost klebicinov smo ugotavljali glede na pojav con inhibicije pri indikatorskih sevih.

**Preglednica 14:** Prisotnost klebicinov pri sevih klebsiel z ESBL

indikatorski sev	sevi klebsiel, ki izločajo klebicine
DH5	/
MC4100	/
2270	<b>514-1, 933-2, 4766, 4755-3, 603-1</b>
933-2	/

Ko smo kot indikatorske seve uporabili *E. coli* DH5, *E. coli* MC4100 in *Klebsiella sp.* 933-2 nismo pri nobenem od testiranih sevov ugotovili prisotnosti klebicinov. Le pet sevov *Klebsiella sp.*: 514-1, 933-2, 4766, 4755-3 in 603-1 je izločalo snovi, ki so zavirale rast indikatorskega seva *Klebsiella sp.* 2270. Od 103 sevov klebsiel iz zbirke jih le 5 (4,8-odstotka) izloča klebicine, ki zavirajo rast enega od indikatorskih sevov. Ker pre malo sevov izloča klebicine, smo nadaljne poskuse tipizacije s klebicini opustili.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Sevi iz rodu *Klebsiella* pogosto povzročajo infekcije pri ljudeh, predvsem v bolnišnicah. Najpogosteje povzročajo težave pri starejših ljudeh, ljudeh z anatomske spremembami sečil in bolniki s katetrskimi vstavki. Za zdravljenje teh infekcij se uporablja protimikrobne učinkovine, kot so sulfametoksazol-trimetoprim,  $\beta$ -laktami in kinoloni. Zlasti slednji se zaradi rezistence proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom pri zdravljenju infekcij s sevi z ESBL pogosto uporablja. Tako je ciprofloksacin v svetovnem merilu najpogosteje predpisana protimikrobna učinkovina. V Sloveniji je uporaba kinolonov t.i. prve generacije, kot je norfloksacin od leta 1997 do leta 2003 upadla za 52-odstotkov, uporaba kinolonov t.i. druge generacije, kot je ciprofloksacin, pa je za 20-odstotkov narasla. Hkrati se je rezistenca proti obema kinolonomu v teh letih enakomerno povečala. Leta 2006 je bilo v Sloveniji proti kinolonom rezistentnih 14,1-odstotkov sevov *K. pneumoniae*, kar je v skladu z evropskim povprečjem. Visok odstotek proti kinolonom rezistentnih sevov najdemo predvsem pri sevih, ki imajo zapis za ESBL (Ferech in sod., 2006 in EARSS annual 2006).

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali zbirkko 103 uropatogenih klebsiel z ESBL, izoliranih v različnih zdravstvenih ustanovah v Ljubljani in okolici. Kar polovica vseh sevov (52) izvira iz domov starejših občanov. Ker so infekcije sečil pogosto ponavljajoče so nekateri sevi izolirani iz istih bolnikov. Celotna zbirkka 103 sevov je izolirana iz 70 različnih bolnikov. V zbirki iz leta 2000 je 14 sevov klebsiel, ki so bili izolirani iz osmih različnih bolnikov, v zbirki iz leta 2001 je devet sevov iz treh bolnikov, v zbirki iz leta 2002 je 11 sevov iz šestih različnih bolnikov, v zbirki iz leta 2003 je 21 sevov iz 20 različnih bolnikov, v zbirki iz leta 2004 je 27 sevov iz dvajsetih različnih bolnikov, v zbirki iz leta 2005 pa je 21 sevov iz 17 različnih bolnikov. Tekom let je glede na standarde CLSI opaziti trend naraščanja števila proti ciprofloksacinu in norfloksacinu rezistentnih sevov klebsiel, ter upadanja števila občutljivih in intermediarnih sevov. Odstotek proti ciprofloksacinu rezistentnih sevov se je iz leta 2000 do leta 2005 povišal iz 50 na 86-odstotkov, odstotek intermediarnih sevov pa zmanjšal iz 50 na 14-odstotkov. Nenaden porast rezistence proti obema kinolonomu je opaziti med letoma 2002 in 2003. Odstotek proti ciprofloksacinu rezistentnih klebsiel je narasel iz 64 na 90-odstotkov, odstotek proti norfloksacinu rezistentnih klebsiel pa je narasel iz 55 na 90-odstotkov. Hkrati se je med tem dvojno letoma odstotek za oba kinolona intermediarnih sevov zmanjšal iz 36 na 10-odstotkov. Natančnejši podatki so navedeni v preglednici 6. Naraščanje deleža proti

kinolonom rezistentnih sevov v svetu povezujejo z vedno pogostejšo uporabo kinolonov. Številni znanstveniki so mnenja, da k temu veliko pripomorejo novo odkrite, na plazmidu kodirane, determinante rezistence proti kinolonom - PMQR. Zato nas je zanimalo ali je vzrok za zmanjšanje števila intermediarnih in večanje števila proti kinolonom rezistentnih sevov v naši zbirki determinantna kodirana na plazmidu.

Ko smo začeli z našo raziskavo, sta bila znana dva plazmidno kodirana gena za rezistenco proti kinolonom – *qnrA* in *qnrS*. Tekom dela pa so bila objavljena poročila o odkritju nove različice gena *qnr* - *qnrB* ter popolnoma nov mehanizem rezistence proti kinolonom. Novi mehanizem temelji na kemijski modifikaciji učinkovine z mutirano različico produkta gena za aminoglikozid acetiltransferazo *aac(6')-Ib-cr*.

Geni *qnr* posredujejo le nizko stopnjo rezistence proti kinolonom in so klinično pomembni samo v sevih, ki imajo tudi mutacije v kromosomskih genih za girazo ali topoizomerazo. Robicsek in sodelavci (2006b) ter Jacoby in sodelavci (2005) so ugotovili, da so geni *qnr* lahko prisotni tudi pri sevih, ki so za klinično koncentracijo kinolonov občutljivi. Zato smo s PCR preverili prisotnost zapisa za *qnrA* pri vseh sevih klebsiel z ESBL iz naše zbirke, vključno s tistimi ki so proti kinolonom občutljivi ali intermediarni. Pri nobenem od testiranih sevov s PCR pri danih pogojih nismo uspeli potrditi prisotnosti zapisa za gen *qnrA*.

Poirel in sod (2005) so odkrili še tri druge različice gena *qnr*, ki se od *qnrA* razlikujejo v 2 do 4 kodonih. Iz ZDA, Kitajske in Evrope pa so poročali tudi o varianti, ki se razlikuje le v enem baznem paru. Če bi bil pri sevih iz naše zbirke prisoten še neznan gen *qnr*, le malo spremenjen na mestu naleganja začetnih oligonukleotidov, ga s PCR z našimi začetnimi oligonukleotidi ne bi zaznali. Da bi dodatno potrdili rezultate PCR ali odkrili morebitno minimalno spremenjeno različico smo naredili hibridizacijo s sondou z delom zapisa za *qnrA* pri t.i. »low stringency« pogojih. Tudi rezultati hibridizacije niso pokazali prisotnosti DNA, ki bi bila podobna genu *qnr*.

Zapis za *qnrS* je bil odkrit pri *S. flexneri* na Japonskem in se s *qnrA* ujema le v 59-odstotkih aminokislin. Gen *qnrB* pa so odkrili v času naše diplomske naloge pri sevu *K. pneumoniae* iz Indije in sicer na plazmidu, ki je vseboval tudi zapis za CTX-M β-laktamazo. QnrB se s QnrA ujema v 40-odstotkih aminokislin. Vloga obeh proteinov je enaka vlogi proteina QnrA

(Jacoby in sod., 2006 in Hata in sod., 2005). Ker se QnrS in QnrB s QnrA ujemata v razmeroma majhnem odstotku aminokislin, smo predvidevali, da delov teh genov s hibridizacijo s sondjo *qnrA* ne bomo zaznali niti pri »low stringency« pogojih. Zato smo na podlagi zaporedja nukleotidov iz baze podatkov »gene bank« sami pripravili začetne oligonukleotide za pomnoževanje dela gena *qnrS*. Različica *qnrB* je bila odkrita in predstavljena na kongresu že leta 2005, nukleotidna sekvenca pa je bila, skupaj z začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje dela gena *qnrB* dosegljiva šele po objavi članka v začetku leta 2006. Za pomnoževanje dela gena *qnrB* smo uporabili začetne oligonukleotide iz tega članka. Zapisa za QnrB in QnrS nismo našli pri nobenem od sevov klebsiel z ESBL iz naše zbirke. Kljub temu, da so vse tri različice genov *qnr* že prisotne v evropskem prostoru, v Sloveniji še niso bile opisane.

Čeprav nismo uspeli dokazati prisotnosti genov *qnr*, nas je zanimalo ali morda na plazmidu obstaja drugačna determinanta, ki posreduje nizko stopnjo rezistence proti kinolonom. Da bi preverili ali je morebitna determinanta del konjugativnega plazmida smo pripravili konjugacije, pri katerih smo za recipientski sev uporabili *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Transkonjugante smo seleкционirali na gojiščih z dodanim ampicilinom, tetraciklinom, kloramfenikolom ali trimetoprimom, saj so zapisi za rezistenco proti navedenim protimikrobnim učinkovinam zelo pogosto prisotni na konjugativnih plazmidih. Za direktno selekcijo transkonjugant nismo uporabili kinolonov, s čimer smo preprečili selekcijo rezistentnih sevov zaradi kromosomskih mutacij. Le tako smo lahko predvidevali, da je transkonjuganta ki zraste po odtisu rezistentna zaradi determinante, ki se je prenesla s plazmidom. Transkonjugante smo odtisnili na trdna Gojišča LB z dodanim ciprofloksacinom v koncentraciji 0,06 µg/ml ozziroma norfloksacinom v koncentraciji 0,1µg/ml. Prav tako smo na teh ploščah preverili rast samega recipientskega seva. Konjugativni prenos rezistence proti kinolonom je uspel pri 27 donorskih sevih. Največ proti kinolonom rezistentnih transkonjugant smo pridobili pri sevih izoliranih v letih 2003 in 2004. V teh letih je bil tudi največji porast v številu proti ciprofloksacinu in norfloksacinu rezistentnih sevov. Za dodatno potrditev konjugativnega prenosa plazmida smo pri štirih naključno izbranih sevih izvedli sekundarne konjugacije, ki so uspele pri treh sevih (pri četrtem je bila kontrola pozitivna).

Da se je s plazmidom prenesel tudi zapis, ki posreduje rezistenco proti kinolonom smo dodatno dokazali z ugotavljanjem MIK za ciprofloksacin. Z difuzijsko metodo Etest smo

nekaterim donorskim sevom klebsiel, njihovim primarnim transkonjugantam in recipientskemu sevu *E. coli* J53, določili MIK za ciprofloksacin. Kot kontrolo smo uporabili sev *E. coli*/pMG252 ter transkonjuganti dveh sevov klebsiel, pri katerih se je konjugativni plazmid prenesel, vendar po odtisu na gojišča z dodanim ciprofloksacinom oziroma norfloksacinom nista zrasli. Z Etesti smo ugotovili, da je MIK recipientskega seva *E. coli* J53 0,008 µg/ml, torej enaka kot so jo določili Jacoby in sod (2003). Enako MIK kot pri recipientskemu sevu smo ugotovili pri obeh negativnih kontrolah, kjer kljub prisotnosti konjugativnega plazmida ni prišlo do povišanja MIK za ciprofloksacin. Posamezni sevi klebsiel torej očitno vsebujejo več konjugativnih plazmidov, a le nekateri imajo zapis za rezistenco proti kinolonom. Pri sevu J53/pMG252 se je MIK glede na divji tip povišala za 47 krat. Pri skoraj vseh donorskih sevih klebsiel je bil MIK višji od 32 µg/ml, MIK transkonjugant pa je bil različen. Tako smo MIK določili pri šestnajstih tanskonjugantah. Od tega se je pri večini (7) MIK glede na recipientski sev povišal za 16-krat (0,125 µg/ml), pri petih transkonjugantah se je MIK povišal za 12-krat (0,094 µg/ml), pri treh sevih za 8-krat (0,064 µg/ml) in pri enem le za dvakrat (0,016 µg/ml). Če povzamemo, se je MIK za ciprofloksacin povišal za 2 do 16-krat. Pri donorskih sevih je bil MIK mnogo višji, zaradi dodatnih kromosomskih mutacij. Mnogi raziskovalci, ki so proučevali plazmidno kodirano rezistenco proti kinolonom, so enako kot mi pridobili transkonjugante z različno zvišanim MIK. Wang in sod. (2003) so pri *E. coli* izoliranih na Kitajskem po prenosu konjugativnega plazmida v recipientski sev zabeležili, da se je MIK transkonjugant zvišala kar za 6 do 250-krat. Pri vseh sevih so kasneje odkrili zapis za Qnr. Podobno zvišanje (47-kratno) smo pri sevu J53/pMG252 z zapisom za QnrA ugotovili tudi mi. Glede na to da z nobeno od prejšnjih metod nismo zaznali prisotnosti genov *qnr* in da je zvišanje MIK naših transkonjugant manjše kot ga posreduje Qnr, smo sklepali, da je na konjugativnih plazmidih naših sevov prisotna drugačna determinanta, ki omogoča nizko stopnjo rezistence proti kinolonom.

V okviru raziskovalnega dela v laboratoriju smo iz plazmidne DNA ene od transkonjugant klonirali fragment z zapisom za rezistenco proti ciprofloksacinu. V času, ko smo analizirali zaporedje nukleotidov so Robicsek in sod. (2006c) opisali nov mehanizem plazmidno posredovane rezistence proti ciprofloksacinu in norfloksacinu. Kodira ga gen za aminoglikozid acetiltransferazo, ki so ga označili kot alel *aac(6')-Ib-cr*. Produkt tega alela je prvi opisan primer rezistence proti kinolonom z encimsko modifikacijo in hkrati prvi primer encima, ki specifično inaktivira dve različni protimikrobnii učinkovini. Produkt alela *aac(6')*-

*Ib-cr* omogoča zvišanje MIK, ki je manjše od tistega pri Qnr. Robicsek in sod. (2006c) so ugotovili da produkt alela *aac(6')-Ib-cr* zviša MIK za ciprofloksacin zgolj za 3 do 4-krat. Ker smo s primerjavo zaporedja nukleotidov determinante na kloniranem fragmentu in objavljenega za poredja za *aac(6')-Ib-cr* ugotovili, da gre za enako različico, smo s PCR pomnožili fragment, ki lahko zajame obe različici acetiltransferaze, pri vseh sevih klebsiel z ESBL iz naše zbirke. Da bi v PCR pomnožku lahko enostavno ločili obe različici, smo pripravili protokol na osnovi restrikcije z encimoma *TaaI* in *NdeI*.

Tako smo mutirano različico alela *aac(6')-Ib-cr* dokazali že pri enem sevu iz leta 2000 in 2001. V obeh primerih sta seva imela tudi divji tip encima. Odstotek sevov, ki divji tip alela ali mutirano različico je skozi leta dokaj enak, teh sevov je povprečno 88-odstotkov. V letu 2003 očitno poraste odstotek sevov, ki imajo zapis za mutirano različico *aac(6')-Ib-cr*. Ta odstotek glede na prejšnje leto poraste iz nič na 71-odstotkov vseh sevov. Od tega je pri 67-odstotkih prisotna samo mutirana različica, pri 33-odstotkih pa mutirana različica in divji tip. Pojavnost *aac(6')-Ib-cr* različice od leta 2000 do leta 2005 naraste s 7 na 54-odstotkov, medtem pa se odstotek divjega tipa zmanjša iz 71 na 52,4-odstotkov. Število sevov pri katerih ni prisoten nobeden od obeh zapisov za aminoglikozid acetiltransferazo se z leti zmanjšuje. Leta 2000 je takih 28,6-odstotkov sevov, leta 2005 pa le še 4,7-odstotkov. Največji odstotek sevov z različico *aac(6')-Ib-cr* smo opazili v letih 2003 in 2004 (71 in 67-odstotkov). V teh letih je hkrati prišlo tudi do očitnega povečanja števila proti ciprofloksacinu in norfloksacinu rezistentnih sevov, saj je teh glede na prejšnje leto več za kar 25 do 35-odstotkov. Zmanjšalo pa se je število občutljivih sevov in sevov z intermediarnim fenotipom. Natančnejši podatki so prikazani v preglednici 6. Iz tega lahko sklepamo, da je nizka stopnja rezistence, ki jo posreduje alel *aac(6')-Ib-cr*, verjeten vzrok za prehod fenotipa od intermediarnega k rezistentnemu. Poleg tega pa njena prisotnost omogoči selekcijo ugodnih kromosomskih mutacij, ki tudi prispeva k dvigu rezistence. Posledica je očitno večje število sevov, ki so rezistentni proti klinično predpisani koncentraciji kinolonov, kakor trdijo tudi Robicsek in sodelavci (2006a).

Prisotnost zapisa za mutirano in divjo različico aminoglikozid acetiltransferaze smo posebej preverili še pri transkonjugantah, s čimer smo želeli ugotoviti katera od obeh različic je dejansko na plazmidih. Pri vseh 27 transkonjugantah smo na plazmidu zasledili le mutirano različico. Donorski sevi le dveh od 27 transkonjugant so imeli poleg mutirane različice še

divji tip, ki ga pri transkonjugantah nismo našli, zato je verjetno prisoten na kromosomu ali pa na drugem plazmidu. Zanimivo je da smo alel *aac(6')-Ib-cr* zasledili tudi pri četrtini sevov, pri katerih se rezistenca proti ciprofloksacinu in norfloksacinu s konjugacijo ni prenesla. Pri teh je ta gen verjetno lociran na kromosomu. Prisotnost mutirane različice gena pri vseh donorskih sevih in transkonjugantah smo dodatno potrdili še s parom začetnih oligonukleotidov pIKREco1/ pIKREco2, ki je specifičen le za to obliko, saj se eden od obeh začetnih oligonukleotidov poveže le s prvimi dvanajstimi nukleotidi, ki so prisotni le na mutiranem alelu.

Park in sodelavci (2006) so preiskovali prisotnost genov za aminoglikozid acetiltransferaze v zbirkri tristotrinajstih proti ciprofloksacinu in ceftazidimu rezistentnih sevov enterobakterij izoliranih v ZDA med leti 1999-2004. Hkrati so preverili tudi prisotnost genov *qnr*. Če primerjamo naše rezultate s to študijo, lahko potrdimo njihove ugotovitve, da so različice gena *qnr* redkejše od gena *aac(6')-Ib-cr* in da oba krožita v populaciji bakterij neodvisno. Zapisi za aminoglikozid acetiltransferaze so v naši zbirkri sevov mnogo bolj pogosti, saj smo zapis za katerokoli od obeh oblik našli pri 38-odstotkih več sevov kot Park in sodelavci (2006). Mutirana oblika *aac(6')-Ib-cr* je bila v zbirkri iz ZDA prisotna pri tretjini, v naši zbirkri pa kar pri polovici vseh sevov, z zapisom za aminoglikozid acetiltransferazo. Pri 25-odstotkih vseh sevov je zapis za *aac(6')-Ib-cr* verjetno prisoten na kromosomu, saj se pri konjugaciji ni prenesel. Vseh teh 25-odstotkov sevov klebsiel, razen enega, ki je proti ciprofloksacin in norfloksacinu intermediaren je rezistentnih proti obema kinolonomu.

Robicsek in sodelavci (2006c) so opazili da se zaradi nove aktivnosti gena *aac(6')-Ib-cr* zmanjša učinkovitost inaktivacije aminoglikozidov. MIK za kanamicin se zmanjša na četrtino prvotne. Do izgube rezistence za klinično koncentracijo aminoglikozida pride le pri amikacinu, kjer se MIK zmanjša na polovico. V skladu s to ugotovitvijo smo preverili rezistenco proti kanamicinu pri naših 27 transkonjugantah. Kljub temu, da imajo vse transkonjugante alel *aac(6')-Ib-cr*, so še vedno rezistentne proti klinični koncentraciji kanamicina.

O genetskem okolju alela *aac(6')-Ib-cr* ni veliko znanega. Različna stopnja povišanja MIK, ki smo jo opazili mi in drugi raziskovalci (Park in sod 2006 in Robicsek in sod 2006c) je verjetno posledica dejstva, da je alel *aac(6')-Ib-cr* na različnih plazmidih. Ker so alel *aac(6')*-

*Ib-cr* izolirali iz predstavnikov različnih rodov enterobakterij je verjetno del različnih plazmidov. Robicsek in sod. (2006c) so ugotovili, da je zapis za *aac(6')-Ib-cr* del integrona, kar omogoča njegovo širjenje. Različnost plazmidov z zapisom za gen *aac(6')-Ib-cr* smo preverili tudi pri transkonjugantah iz naše zbirke. Iz transkonjugant smo izolirali pDNA ter jo razrezali z restriktičnim encimom. Nato smo analizirali nastale fragmente in glede na skupne fragmente enake velikosti plazmide uvrstili v skupine. Ugotovili smo, da se pri transkonjugantah iz naše zbirke pojavljata dve različni skupini plazmidov - skupina 1 in 2, pri katerih se restriktični vzorec močno razlikuje. V skupini 2 pa se plazmidi razlikujejo le po manjšem številu fragmentov. Skupino 2 smo razdelili na podkupine a, b in c. V posameznih skupinah 1, 2a in 2b so združeni enaki plazmidi, v skupini 2c pa je združenih več zelo podobnih plazmidov. Tako smo ugotovili, da je gen *aac(6')-Ib-cr* pri naših transkonjugantah del dveh različnih plazmidov, ki se razlikujeta v osnovnem ogrodju. Plazmidi z enakim ogrodjem pa se med seboj minimalno razlikujejo.

Da bi ugotovili ali je razširjanje gena *aac(6')-Ib-cr* za rezistenco proti kinolonom posledica klonalnega razsoja posameznih sevov ali pa horizontalnega razširjanja plazmidov v bakterijski populaciji smo podatke o različnosti plazmidov žeeli dopolniti s podatki o različnosti sevov iz naše zbirke. Ker nam metoda elektroforeze v pulzirajočem polju zaradi prevelikih stroškov ni bila na voljo, smo seve klebsiel žeeli tipizirati na osnovi izločanja klebicinov. Ugotovili smo, da pre malo sevov izloča klebicine, ki jih lahko zaznamo z našimi indikatorskimi sevi. Tipizacija sevov naše zbirke s klebicini bi bila zato prezapletena in zamudna. O epidemiologiji gena *aac(6')-Ib-cr* smo zato skušali sklepati le na podlagi različnosti plazmidov in podatkih o izvoru sevov.

Plazmid iz skupine 1 je prisoten le pri sevih izoliranih v bolnišnici Trbovlje in Zdravstvenemu domu v Litiji. Skupina 2a je večinoma prisotna pri sevih iz Doma starejših občanov Kolezija ter enem sevu iz urološke ambulante v Ljubljani. Skupina 2b je najbolj pogosta pri sevih iz bolnišnice Trbovlje, prisotna pa je tudi pri dveh sevih iz Doma starejših občanov Kolezija in enem sevu iz Zdravstvenega doma Šiška. Skupina 2c, ki združuje več različnih plazmidov z minimalnimi razlikami je razširjen po vseh štirih ustanovah, razen v Zdravstvenem domu Litija. Iz sevov iz nobene od ustanov nismo izolirali plazmida z vedno enakim restriktičnim profilom. Glede na to, da smo ugotovili, da gre za različne plazmide, ki niso omejeni na

posamezne zdravstvene ustanove bi lahko sklepali, da ne gre za klonalni razsoj enega seva, temveč za razširjanje gena na plazmidih v različnih sevih klebsiel.

Pri horizontalnem širjenju genov za rezistenco proti protimikrobnim učinkovinam so pomembni tudi integroni. Martinez-Freijo in sod. (1998) so v študiji, ki je vključevala klinične izolate po Gramu negativnih bakterij iz vse Evrope ugotovili, da so integroni prisotni pri 43-odstotkih sevov. Vsi ti sevi so bili statistično bolj pogosto rezistentni proti kinolonom, aminoglikozidom in  $\beta$ -laktamom. White in sod. (2001) so v študijo vključili le uropatogene seve enterobakterij, kjer je integrone imelo 43-odstotkov sevov. Najpogosteji so bili integroni z razreda 1, z genskimi kasetami za rezistenco proti trimetoprimu in aminoglikozidom.

Pri zbirki klebsiel z ESBL smo preverili prisotnost integrnov razreda 1, 2 in 3 na osnovi kombinirane metode PCR-RFLP. Integrone razreda 1 smo odkrili pri 87,4-odstotkih sevov. Integrnov razreda 2 in 3 nismo našli. Kar deset od trinajstih sevov, pri katerih integrnov nismo našli je imelo konjugativni plazmid, ki je imel le zapis za rezistenco proti ampicilinu, ne pa tudi tetraciklinu, trimetoprimu, in kloramfenikolu. Verjetno ni naključje, da je od deset sevov v zbirki ki so občutljivi za sulfametoksazol-trimetoprim, kar šest takih pri katerih integrnov nismo našli. Kot je ugotovil White in sod. (2001) je zapis za rezistenco proti trimetoprimu največkrat del integrona. Prav trimetoprim pa se najpogosteje uporablja pri infekcijah sečil. To je verjetno eden izmed razlogov, da je odstotek sevov z integroni pri naši zbirki mnogo višji kot so ga ugotovili White in sodelavci (2001). Prisotnost zapisov za rezistenco proti trimetoprimu, ampicilinu in kinolonom na integrnu tako ob nepravilni uporabi ene od teh protimikrobnih učinkovin, omogoča ko-selekcijo vseh treh rezistenc hkrati.

## 5.1 SKLEPI

- V Inštitutu za varovanje zdravja v Ljubljani so v letih 2000-2005 izolirali 103 uropatogene seve klebsiel z ESBL.
- Pri zbirki sevov klebsiel z ESBL se je z leti število sevov z intermediarnim fenotipom zmanjšalo, število rezistentnih sevov pa narastlo.

- Pri nobenem izmed 103 sevov klebsiel iz zbirke nismo odkrili zapisa za rezistenco proti kinolonom *qnrA*, *qnrS* in *qnrB*.
- Pri 91 (88-odstotkih) sevih klebsiel z ESBL iz zbirke smo odkrili zapis za encim aminoglikozid acetiltransferazo, od tega je bil divji tip prisoten pri 59 (65-odstotkih) sevih, mutirana različica *aac(6')-Ib-cr* pa pri 47 (52-odstotkih) sevov.
- Pri primarni konjugaciji donorskih klebsiel z ESBL z recipientskim sevom *E. coli* J53Az<sup>r</sup> se je rezistenca proti ciprofloksacinu in norfloksacinu prenesla pri 27 sevih.
- Pri sekundarni konjugaciji štirih primarnih transkonjugant z recipientskim sevom *E. coli* RU4404 Cm<sup>r</sup> se je rezistenca proti ciprofloksacinu in norfloksacinu prenesla pri štirih sevih.
- Vsem izbranim primarnim transkonjugantam donorskih sevov klebsiel z ESBL se je MIK za ciprofloksacin povišala glede na recipientski sev *E. coli* J53Az<sup>r</sup>.
- Pri vseh 27 primarnih transkonjugantah smo na prenešenem konjugativnem plazmidu odkrili zapis za *aac(6')-Ib-cr*, medtem ko divjega tipa gena nismo odkrili pri nobeni od transkonjugant.
- Pri 90 (87,4-odstotkih) sevih klebsiel z ESBL iz zbirke smo odkrili zapis za integrone razreda 1, integrонov razreda 2 in 3 nismo odkrili.
- Restriktijska analiza plazmidne DNA izolirane iz transkonjugant je pokazala dve glavni skupini konjugativnih plazmidov in več podtipov z manjšimi razlikami.
- Zbirko sevov klebsiel z ESBL smo žeeli tipizirati s pomočjo klebicinov, vendar se je metoda izkazala za neuspešno, elektroforeze v pulzirajočem polju zaradi prevelikih stroškov nismo naredili.
- Glede na različnost plazmidov in izvor sevov smo sklepali, da je porast v številu proti kinolonom rezistentnih sevov, verjetno posledica na različnih plazmidih prisotnega alela *aac(6')-Ib-cr* in ne klonalnega razsoja posameznih sevov.

## 6 POVZETEK

Sevi iz rodu *Klebsiella* povzročajo infekcije predvsem pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom v bolnišničnem okolju. Med drugim povzročajo tudi infekcije dihal in sečil, ki so med najpogostejišimi infekcijami v razvitih državah. Za zdravljenje teh infekcij se najpogosteje uporablja protimikrobne učinkovine kot so sulfametoksazol-trimetoprim, ter  $\beta$ -laktami in kinoloni. Zaradi pogoste uporabe teh učinkovin število rezistentnih sevov hitro narašča.

Točkovne mutacije v kromosomskih genih za bakterijske topoizomeraze so bile do nedavnega edini poznan mehanizem rezistence proti kinolonom. Danes pa sta znana že dva plazmidno kodirana proteina, ki posredujeta nizko rezistenco proti kinolonom. To sta *qnr* in *aac(6')-Ib-cr*. Geni za te proteine so še posebno pri klebsielah največkrat na konjugativnih plazmidih skupaj z geni za ESBL. V diplomskem delu smo pri zbirki uropatogenih klebsiel z ESBL preverili prisotnost zapisov za plazmidno kodirane determinante rezistence proti kinolonom. Zapisov za proteine Qnr nismo našli pri nobenem od sevov, medtem ko smo zapis za mutirano različico aminoglikozid acetiltransferaze *aac(6')-Ib-cr* odkrili pri 45,6-odstotkih sevov. Mobilnost determinante za rezistenco proti kinolonom smo dokazali v poskusu konjugacij donorskih sevov klebsiel z ESBL z recipientskim sevom *E. coli* J53. Prisotnost zapisov za aminoglikozid acetiltransferaze smo pri primarnih transkonjugantah še enkrat preverili in dokazali, da je mutirana različica *aac(6')-Ib-cr* pri vseh prisotna.

Velik porast v številu rezistentnih sevov je lahko posledica klonalnega razsoja sevov ali pa razširjanja plazmidov z determinanto rezistence v populaciji bakterij. Na podlagi restriksijskega profila iz transkonjugant izoliranih plazmidov smo ugotovili, da sta pri sevih v naši zbirki dve glavni skupini plazmidov ter več plazmidov z manjšimi medsebojnimi razlikami. Iz tega smo sklepali, da je vzrok za porast rezistence proti kinolonom pri sevih klebsiel z ESBL v naši zbirki, verjetno horizontalni prenos plazmidov v populaciji.

Geni za rezistence so zelo pogosti v integronih, ki omogočajo njihovo hitro razširjanje. Preverili smo prisotnost integronov, ki smo jih odkrili pri 87,4-odstotkih bakterij, vsi so pripadali razredu 1

## 7 VIRI

- Acar J. F., Goldstein F. W. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 24,1:67-73
- Amábile-Cuevas, C. F., 2007. Antimicrobial resistance in Bacteria. Norfolk. Horizon Bioscience
- 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  $\beta$ -lactamases. *Biochemical Journal*, 276:269-270
- Arakawa Y. M., Murakami K., Suzuki H. I., Wacharotayankun R., Ohsuka N., Kato N., Ohta M. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene bla<sub>IMP</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1612-1615
- 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
- Bauernfield A., Petermuller C., Schneider R. 1981. Bacteriocins as tools in analysis of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 14, 1: 15-19
- Bauernfeind A, Casellas J.M., Goldberg M., Holley M., Jungwirth R., Mangold P., Röhnisch T., Schweighart S., Wilhelm R. 1992. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*, 20,3:158–163
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:1-14
- Boyd D. A., et al. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase involved in an outbreak in long-term facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:3758-3764
- Bradford P. A., 2001. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>th</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 48:933-951
- Brun-Buisson C., Legrand C. P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., Duval J. 1987. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during a nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, 2:302-306

- Bret L., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. 1996. Characterisation of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2  $\beta$  lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 38:183-191
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A.A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:1211-1233
- Campbell W. N., Hendrix E., Cryz S., Cross A. S. 1996. Immunogenicity of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma. *Clinical Infectious Diseases*, 23:179-181
- Carpenter J.L. 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Reviews of Infectious Diseases*, 12:672-682
- Casellas J. M. 1999. South America: A different continent, different ESBLs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44:16
- Caselas J. M., Tome G., Bantar C., Bertolini P., Blazquez N., Borda N., Couto E., Cudmani N., Guerrera 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 piperacillin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 47:247-257
- Chang F. Y., Siu K., Fung C. P., Huang H. Ilo M. 2001. Diversity of SHV and TEM  $\beta$  lactamase in *Klebsiella pneumoniae* gene evolution in northern Taiwan and two novel  $\beta$  lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:2407-2413
- Collis C. M., Hall R. M. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39:155-162
- Coovadia Y.M., Johnson A. P., Bhana R.H., Hutchinson G. R., George R.C., Hafferjee I. E. 1992. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintainance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *The Journal of Hospital Infection*, 22,3:197-205
- 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
- Edmondson A. S., Cooke E. M. 1979. The development and assessment of a bacteriocin typing method for *Klebsiella*. Journal of Hygiene, 82:207-223
- Ellington M. J., Woodford N. 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57:1026-1029
- Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C., Goossens H, on behalf of the ESAC project group. 2006. European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58:423-427
- Gay K., Robicsek A., Strahilevitz J. et al. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi *Salmonella*. Clinical Infectious Diseases, 43:297-304
- Gratia J. P. 2000. Andre Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics. Genetics, 156:471-476
- Greenwood D., Slack R., Peutherer J. 1998. Medical Microbiology A guide to microbial infections; pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 15<sup>th</sup> edition. Educational Low-Priced Sponsored Texts. Hong Kong.
- Hata M., Sizuki 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
- Heddle J. G., Blance S. J., Zamble D. B., et al. 2001. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. Journal of Molecular Biology, 307:1223-34
- Hegde S. S., Vetting M. W., Roderick S. L., et al. 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science, 308:1480-83
- Heffernan H., Wodhouse R. 2006. Prevalence of extended-spectrum β-lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* in New Zealand in 2006. Communicable Disease Group.
- [http://www.surv.esr.cri.nz/PDF\\_surveillance/Antimicrobial/ESBLPrevalence\\_2006.pdf](http://www.surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Antimicrobial/ESBLPrevalence_2006.pdf)  
(12.05.2007)

- Helfand M. S., Bonomo R. A. 2006. Extended-spectrum  $\beta$ -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
- Jacoby G. A., Chow N., Waites K. B. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:559-562
- Jacoby G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41,2:120-126
- Jacoby G. A., Walsh K. E., Mills D. M., Walker V. J., Oh H., Robicsek A., Hooper D. C. 2006. *qnrB*, Another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50,4: 1178-1182
- Jacoby G. A., Muñoz-Price L. S. 2005. The New  $\beta$ -Lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352: 380-391
- Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon, A. 1998. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10:867–78
- Juteršek B. 2005. Molekularna tipizacija in opis ESBL producirajočih sevov bakterije *Klebsiella pneumoniae*. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, podiplomski študij biomedicine
- Levesque C. S., Brassard J., Lapointe J., Roy P. H. 1994. Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene*, 142:49-54
- Livermore D. M. 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 557–584
- Madigan T. M., Martinko M. J., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> 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
- Martinez-Freijo P., Fluit A. C., Schmitz F. J., Grek V. C. S., Verhoef J., Jones M. E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and

- association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 42:689-696
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G. A. 1998. Quinolone resistance from transferable plasmid. *Lancet Infectious Diseases*, 351, 9105: 797-799
- Mazel D., Dychinco B., Webb W. A., Davies J. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*, 280:605-608
- Medeiros A. A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1:19–45.
- Minakhina S., Kholodii G., Mindlin S., Yurieva O., Nikiforov V. 1999. Tn5053 family transposons are res site hunters sensing plasmidal res sites occupied by cognate resolvases. *Molecular Microbiology*, 33:1059-1068
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1999. *Medical microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Misouri, 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
- Paauw A., Fluit A. C., Verhoef J., Leverstein-van Hall M. A. 2006. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emergence of Infectious Diseases*, 12:807-812
- Park C. H., Robicsek A., Jacoby G. A., Sahm D., Hooper D. C. 2006. Prevalence in the United states of *aac(6')-lb-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1:  
3953-3955
- Paterson D. L., Hujer K. M., Hujer A. M., YeiserB., Bonomo M. D., Rice L. B., Bonomo R. A. and the International *Klebsiella* Study Group. 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, 47:3554-3560
- Paterson D. L., Bonomo R. A., 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology reviews*, 18,4:657-686

- Petroni A., Corso A., Melano R., Cacace M. L., Bru A. M., Rossi A. *et al.* 2002. Plasmidic extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1462–1468
- Podschun R., Ullmann U. 1998. *Klebsiella sp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 4: 589-603
- 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
- Riley M. A., Wertz J. E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56:17-137
- 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., Sahm D. F., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2006b. *Qnr* prevalence in ceftazidime resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:2872-2874
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G. A., Macielag M., Abanat D., Hye Park C., Bush K., Hooper D. C. 2006c. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12,1: 83-88
- Rodriguez-Villalobos H., Malaviolle V., Frankard J., De Mendoça R., Nonhoff C., Deplano A., Byl B., Struelens M. J. 2005. Emergence of CTX-M extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Belgium. *Eurosurveillance*, Weekly, 10:24/02/2005.
- Schmitz F. J., Martinez-Freijo P., Theis S., Fluit A. C., Verhoef J., Heinz H. P., Jones M. E. 1999. Prevalence of class I integrons and association with decreased antibiotic susceptibility in Gram negative blood culture isolates. *Clinical and Microbiological Infections*, 5:496-498
- Shen L. L., Kohlbrenner W. E., Weigl D., Baranowski J. 1989. Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:2973-2978
- Sherley M., Gordon D. M., Collignon P. J., 2003. Species differences in plasmid carriage in the *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* 49:79-85
- Silva J. 1996. Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*, 57 (Suppl. A): 30-35

- Slopek S. 1978. Phage typing of *Klebsiella*. Methods in Microbiology, 11: 193-222
- Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology, Washington
- 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
- 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
- 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
- Vahabboglu H., Saribas S., Akbal H., Ozturk R., Yücel A. 1998. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1 type and/or OXA-10-type  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42:269–270
- 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. 2003a. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 47:2242-2248
- Wang H., Kelkar S., Wu W., Chen. M., Quinn J. P. 2003b. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$  lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47:790-793

- Wang M., Sahm D. F., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 48:1295-1299
- Wetzstein H. G., Schmeer N., Karl W. 1997. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4272-4281
- White P. A., Rawlinson W. D. 2001. Current status of the *aadA* and *dfr* gene cassette families. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, 47:495-496
- 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
- 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
- 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, Enota medodelčnega študija genetike.

## **ZAHVALA**

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem dr. Jerneji Ambrožič za odlično vodenje, potrpežljivost in prilagodljivost. Za dobro voljo in številne nasvete se zahvaljujem tudi prof. dr. Miklavžu Grabnarju ter vsem na katedri za genetiko in katedri za mikrobiologijo.

Zahvala gre tudi Alenki Smole iz Inštituta za varovanje zdravja za vestno delo pri zbiranju kliničnih izolatov.

Hvala tudi staršem za finančno podporo ter vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani.