



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA
MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PROTI KARBAPENEMOM
ODPORNIH SEVOV BAKTERIJE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IZ
KUŽNIN IN OKOLJA

julij, 2019

Andrej Golle

mentorica: prof. dr. Maja Rupnik

UDK: 579.841.1:575.111/.22+615.33.015.8 (043.3)

IZVLEČEK

Pseudomonas aeruginosa je oportunistična vseprisotna bakterija, ki se nahaja v vlažnem okolju v zdravstvenih ustanovah in okolju. Občasno jo osamimo kot del normalne človeške mikrobiote. Pri bolnikih z dejavniki tveganja lahko povzroča hujše okužbe povezane z zdravljenjem. Bakterija je intrinzično odporna proti številnim antibiotikom. Karbapenemi so med maloštevilnimi zdravili, ki so na voljo za zdravljenje psevdomonasnih okužb, vendar tudi odpornost proti karbapenemom narašča.

P. aeruginosa iz bolnišnic lahko prehaja v komunalni sistem odpadnih vod in od tam v vode čistilnih naprav. V naši nalogi smo primerjali klinično pomembne proti karbapenemom odporne *P. aeruginosa* (CRPA) in CRPA, ki smo jih osamili iz vod čistilnih naprav, in ugotavljali prekrivanje genotipov ter morebitne razlike v prisotnosti genov za odpornost in virulenco.

Zbrali smo seve CRPA iz več zdravstvenih ustanov, ki smo jih osamili iz urina in dihal v obdobju od 1.1.2014 do 31.12.2014. V istem obdobju smo prav tako mesečno vzorčili vodo iz iztoka čistilnih naprav in na selektivnem gojišču osamili seve CRPA. Občutljivost za ceftazidim, cefepim, piperacilin/tazobaktam, imipenem, meropenem, ciprofloksacin, tobramicin, gentamicin, amikacin in netilmicin smo določali z disk difuzijsko metodo po EUCASTu (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/). Vse seve smo tipizirali s pulzno gelsko elektroforezo. Za vsak pulzotip smo izbrali enega do devet predstavnikov, katerim smo nato določili sekvenco celotnega genoma (WGS). Na osnovi tega smo izvedli in silico tipizacijo MLST (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>) in analizo rezistenčnih ter virulenčnih determinant (<https://card.mcmaster.ca/> in www.genomicepidemiology.org).

Skupaj smo osamili 213 CRPA sevov (65 pulzotipov), od tega je bilo 130 sevov iz kliničnih vzorcev (38 pulzotipov) in 83 sevov iz okoljskih vzorcev (31 pulzotipov). Najpogostejšemu kliničnemu pulzotipu (Pt1) je pripadalo 57 sevov (45,6 %), našli pa smo ga samo v večji učni bolnišnici. Samo dva pulzotipa (Pt17 in Pt63) sta bila prisotna tako v večji učni bolnišnici kot tudi v manjših zdravstvenih organizacijah. Med okoljskimi sevi smo 26 pulzotipov osamili iz večje čistilne naprave, medtem ko smo 11 pulzotipov osamili iz manjše čistilne naprave. Podobno kot med kliničnimi sevi je tudi med sevi iz čistilnih naprav prevladoval posamični pulzotip (Pt10 – 21,7 %). Z MLST smo med 112 analiziranimi sevi določili 49 ST. Le 10 ST smo osamili tako iz kliničnih kot iz okoljskih vzorcev, med njimi tudi po vsem svetu razširjena tipa ST111 in ST235.

Prekrivanje med pulzotipi in MLST tipi CRPA, ki smo jih osamili iz kužnin bolnikov oz. iz vzorcev okolja, je bilo nizko. Le devet pulzotipov se je pojavljalo na več kot eni lokaciji (zdravstveni ustanovi/čistilni napravi).

Klinični in okoljski sevi CRPA so se razlikovali glede odpornosti proti protimikrobnim zdravilom. Največji delež kliničnih izolatov je bil odporen proti piperacilinu s tazobaktamom (52,3 %) in ceftazidimu (42,3 %). Največji delež okoljskih izolatov je bil odporen proti ceftazidimu in (37,1 %) in ciprofloksacinu (35,5 %). Večina izolatov je bila odporna samo proti imipenemu in/ali meropenemu. Pri sevih, ki so bili dodatno odporni proti še drugim protimikrobnim zdravilom, smo opisali devet različnih vzorcev odpornosti. Pri kliničnih sevih smo opazili vse vzorce odpornosti, medtem ko smo pri okoljskih sevih opazili le dodatne 4 vzorce odpornosti.

Z analizo rezistoma smo potrdili prisotnost različnih genov, ki nosijo zapise za intrinzične mehanizme odpornosti. Razen tega smo v genomih našli gene povezane s horizontalnim genskim prenosom, kot so geni za karbapenemaze (16 % sevov) in različne encime, ki modificirajo aminoglikozide. Prav tako smo potrdili prisotnost mutacij v girazi (33 % sevov). Vsi sevi, ki so imeli gene za karbapenemaze, so bili odporni proti 3 ali več razredom antibiotikov.

S sekvenciranjem celotnega genoma smo določili tudi prisotnost virulenčnih genov med analiziranimi sevi. Sevi iz okolja in klinični sevi se med seboj večinoma niso razlikovali v prisotnosti genov za dejavnike virulence. Izjemo so predstavljali geni za eksotoksine Y, U, T in S, ki se izločajo s sekrecijskim sistemom tipa III. Večina sevov je imela gene za eksotoksina Y in T, medtem ko so bili geni za eksotoksina U in S prisotni le pri 14 oz. 36 sekvenčnih tipih. Geni za eksotoksin S in U so bili bolj pogosti pri kliničnih sevih, medtem ko so bili geni za eksotoksin T bolj pogosti med okoljskimi sevi.

Nizka stopnja prekrivanja med kliničnimi in okoljskimi CRPA sevi, ki smo jo dokazali v naši nalogi kaže, da gre za dva medsebojno neodvisna rezervoarja. Ugotavljamo tudi, da imajo sevi CRPA iz bolnišničnega okolja nekoliko drugačen set virulenčnih determinant in bolj raznolike vzorce odpornosti.

Ključne besede: *Pseudomonas aeruginosa*, okužbe, čistilne naprave, protimikrobna odpornost, virulenca, karbapenemi, betalaktamaze, čistilne naprave.

Title: MOLECULAR CHARACTERISATION OF CARBAPENEM-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM PATIENTS AND THE ENVIRONMENT

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium and is ubiquitous in humid environments inside and outside of hospitals and is occasionally detected as a part of human microbiota. In predisposed patients *P. aeruginosa* causes severe hospital acquired infections. It is intrinsically resistant to many antibiotics. Carbapenems are among the few available options for treatment of *P. aeruginosa* infections, but the carbapenem resistance is increasing worldwide. As *P. aeruginosa* from hospitals could potentially be transmitted to the wastewater systems the aim of our study was to compare clinically relevant carbapenem resistant *P. aeruginosa* (CRPA) with CRPA isolates from two wastewater treatment plants (WWTP) and to detect possible overlap in genotypes, resistance determinants and virulence genes.

During the twelve-month period (1.1.2014 – 31.12.2014) CRPA cultivated from urine and respiratory diagnostic samples in the laboratory serving several health care facilities were collected. Two WWTPs were sampled monthly and CRPA were isolated on selective media. Susceptibility for ceftazidime, cefepime, piperacilin/tazobactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, tobramycin, gentamycin, amikacin and netilmicin was determined by disk diffusion method according to EUCAST standards (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/). All strains were PFGE typed. For each pulsotype from one to nine representatives were selected and subjected to whole genome sequencing (WGS). Sequences were used for MLST (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>) and for analysis of resistance and virulence determinants (<https://card.mcmaster.ca/> and <http://www.genomicepidemiology.org/>).

Altogether 213 CRPA strains (65 pulsotypes) were collected, of which 130 were from clinical samples (38 pulsotypes) and 83 were from environmental samples (31 pulsotypes).

The most common clinical pulsotype (Pt1) was encountered in 57 strains (45,6 %), but was present only in larger teaching hospital. Only two pulsotypes (Pt17 and Pt63) were found in larger teaching hospital as well as in smaller health care institutions.

Among environmental CRPA strains 26 pulsotypes have been found in a larger WWTP and 11 pulsotypes in smaller WWTP. Similar as among clinical strains also here a single pulsotype was prevalent (Pt10 – 21,7 %). With MLST typing we distributed 112 analysed strains into 49 STs. Only 10 STs overlapped between environment and patients, among them the worldwide

spread types ST111 and ST235. Overlap between CRPA genotypes from patients and WWTP according to PFGE and MLST typing was low. Only 9 pulsotypes were shared between two or more settings (hospitals or WWTP).

Clinical and environmental CRPA strains differed in antibiotic resistance. The highest proportion of clinical isolates was resistant to piperacillin/tazobactam (52.3 %) and ceftazidime (42.3 %). The highest proportion of environmental isolates was resistant to ceftazidime (37.1 %) and ciprofloxacin (35.5 %). The majority of isolates was resistant only to imipenem and/or meropenem. Strains were distributed into ten different patterns. All of them included clinically relevant strains, while environmental strains showed only four resistance patterns in addition to carbapenem resistance only.

Resistome analysis demonstrated variety of intrinsic resistance mechanisms, but also genes associated with horizontal gene transfer (HGT) such as genes for carbapenemases from VIM family (16 % of strains), mutations in gyrase (33 % of strains), and genes for different aminoglycoside modifying enzymes. All strains with carbapenemases were resistant to 3 or more classes of antibiotics.

Virulence genes assessed from WGS were mostly uniformly distributed across the analysed strains. Exemptions were genes for type III secretion systems associated exotoxins Y, U, T and S. Genes for exotoxins Y and T were present in the majority of isolates, while genes for exotoxins U and S were present only in 14 and 36 ST, respectively. Genes associated with exotoxins S and U were somewhat more frequent in clinical strains, while genes associated with exotoxin T were more frequent in environmental strains.

In summary, we have shown a low overlap between clinically relevant and environmental CRPA genotypes, indicating that these two reservoirs are independent. CRPA in hospital environment have slightly different set of virulence determinants and higher variety of resistance patterns.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, infections, antimicrobial resistance, virulence, carbapenems, beta-lactamases, wastewater treatment plants.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK.....	2
ABSTRACT	4
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1. UVOD	9
1.1 Hipoteze	10
2 PREGLED OBJAV	11
2.1 Bakterija <i>P. aeruginosa</i>	11
2.2 Klinični pomen bakterije <i>P. aeruginosa</i>	11
2.3 Mehanizmi odpornosti pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>	12
2.3.1 Odpornost proti karbapenemom pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>	13
2.3.2 Odpornost proti drugim betalaktamom pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>	14
2.4. Virulenčni dejavniki pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>	15
2.5 Bakterija <i>P. aeruginosa</i> v izvenbolnišničnem in bolnišničnem okolju.....	23
2.6 Metode tipizacije bakterije <i>P. aeruginosa</i>	24
2.6.1 Pregled molekularnih tipizacijskih metod	24
2.6.1.1 Metode, ki temeljijo prikazu fragmentov DNK.....	25
2.6.1.2 Metode, ki temeljijo na hibridizaciji.....	27
2.6.1.3 Metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja.....	27
2.6.1.3.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij – MLST (<i>angl.</i> : multilocus sequence typing).....	28
2.6.1.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma – WGS (<i>angl.</i> whole genome sequencing).....	29
2.6.2 Uporaba molekularnih metod za tipizacijo <i>P. aeruginosa</i>	31
2.7. Genom bakterije <i>P. aeruginosa</i>	32
2.7.1 Akcesorni genom <i>P. aeruginosa</i>	33
2.8 Študije primerjalne genomike pri bakteriji <i>P. aeruginosa</i>	34
2.9. Vloga okoljskih rezervoarjev pri širjenju odpornosti proti antibiotikom pri <i>P. aeruginosa</i>	34
3. METODE DELA	36
3.1 Izbor sevov <i>P. aeruginosa</i> iz kužnin.....	37
3.2 Osamitev in izbor sevov <i>P. aeruginosa</i> iz vzorcev čistilnih naprav.....	39
3.3 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju	39
3.4 Sekvenciranje celotnega genoma.....	40
3.5 MLST tipizacija.....	41
3.6. Analiza genomskih sekvenc – rezistenca in dejavniki virulence	41

4. REZULTATI	42
4.1 Proti karbapenemom odporni sevi <i>P. aeruginosa</i> iz bolnišnic in čistilnih naprav	42
4.2 Določitev pulzotipov proti karbapenemom odpornih sevov <i>P. aeruginosa</i> z elektroforezo v pulzirajočem električnem polju	42
4.3 Razporeditev tipov MLST med kliničnimi in okoljskimi sevi <i>P. aeruginosa</i>	45
4.4 Odpornost proti drugim protimikrobnim zdravilom pri proti karbapenemom odpornih sevih <i>P. aeruginosa</i> iz bolnišnic in čistilnih naprav	50
4.5 Ugotavljanje prisotnosti genov in regij, povezanih z odpornostjo	53
4.6 Ugotavljanje prisotnosti genov in regij povezanih z virulenco	57
5. RAZPRAVA	59
5.1. Raznolikost genotipov v bolnišničnem okolju	59
5.2. Raznolikost genotipov v čistilnih napravah	60
5.3 Majhno prekrivanje genotipov med okoljskimi in kliničnimi sevi	60
5.4. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v fenotipskih vzorcih odpornosti na antibiotike	61
5.5. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v prisotnosti genov za odpornost na antibiotike	62
5.6. Razlike med ugotovljeno genotipsko in fenotipsko odpornostjo	64
5.7. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v dejavnikih virulence	66
6. ZAKLJUČKI IN POTRDITEV HIPOTEZ	68
7. POVZETEK	70
8. LITERATURA	76
9. ČLANEK KOT DEL DOKTORSKE DISERTACIJE	95
10. PRILOGE	96
PRILOGA I	96
Priloga III:	98
Priloga IV.:	99
11. DELOVNI ŽIVLJENJEPIS	100
12. ZAHVALA	102
13. IZJAVA	103

SEZNAM OKRAJŠAV

AME – aminoglikozide inaktivirajoči encimi

CRPA – proti karbapenemom odporni *Pseudomonas aeruginosa*

HGT – horizontalni genski prenos

MALDI-TOF - masna spektrometrija z metodo ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem (MALDI) in masnim analizatorjem na čas preleta ionov

MBL– metalo-betalaktamaza

MGE – mobilni genetski elementi

MLST – tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij

NGS – sekvenciranje naslednje generacije

ORF – odprti bralni okvir

PDC – psevdomonasne cefalosporinaze

PFGE – gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem

RE–restriksijski encim

SNP – polimorfizem posameznega nukleotida

ST – sekvenčni tip

T3SS – sekrecijski sistem tipa 3

VIM – metalo-betalaktamaza iz skupine VIM

WGS – tipizacija na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja celotnega genoma

1. UVOD

Pseudomonas aeruginosa je v okolju vseprisotna oportunistična patogena bakterija. Redko povzroča okužbe pri sicer zdravih osebah, kadar pa je obrambna sposobnost organizma lokalno ali v celoti okrnjena, lahko povzroča hude okužbe. Te zlasti povzroča v povezavi z zdravstvom (1, 2).

Bakterija *P. aeruginosa* je že po naravi (t.j. intrinzično) odporna proti številnim protimikrobnim zdravilom. Zato je za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo divji tipi *P. aeruginosa*, na voljo le omejen izbor zdravil. Izbor protimikrobnega zdravila pa zaplete tudi pogosta pridobljena odpornost, ki se lahko pojavi tudi tekom zdravljenja (2, 3, 4, 5).

Karbapenemi, ki sodijo v skupino betalaktamskih protimikrobnih zdravil s širokim spektrom delovanja, med njimi zlasti imipenem in meropenem, so zdravila izbora za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa* odporen proti ostalim protipsevdomonasnim učinkovinam. Vendar se tudi pri *P. aeruginosa* proti karbapenemom pojavlja odpornost, ki postaja vse večji problem tudi v našem okolju.

Vir bolnišničnih okužb s *P. aeruginosa* v strokovni literaturi pogosto povezujejo z odtoki vodovodnih napeljav (6, 7, 8, 9, 10). Iz vodovodnega sistema bolnišnic *P. aeruginosa* lahko prehaja v komunalni sistem odpadnih vod in od tam v vode čistilnih naprav (11, 12).

V raziskavi bomo ugotavljali ali proti karbapenemom odporne seve *P. aeruginosa*, ki smo jih osamili pri bolnikih, lahko zaznamo tudi v okolju.

Cilji naše raziskave so:

- ugotavljanje pogostnosti proti karbapenemom odpornih sevov pri bolnikih v SV Sloveniji in ugotavljanje prisotnosti proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* v izvenbolnišničnem okolju
- molekularna opredelitev sevov iz kužnin in vzorcev čistilnih naprav ter ugotavljanje podobnosti med kliničnimi in okoljskimi sevi
- sekvenciranje celotnega genoma pri izbranih predstavnikih
- molekularna določitev prenosljivih mehanizmov odpornosti proti karbapenemom pri okoljskih in kliničnih sevih – potrditev in določitev tipov in podtipov karbapenemaz
- pogostnost in določanje genetskih determinant nekaterih virulenčnih dejavnikov
- ugotavljanje sočasne odpornosti proti karbapenemom in drugim protipsevdomonasnim zdravilom pri kliničnih in okoljskih sevih

1.1 Hipoteze

Postavili smo naslednje hipoteze:

- proti karbapenemom odporni sevi izolirani iz iztoka čistilnih naprav bodo le deloma podobni proti karbapenemom odpornim sevom iz kužnin (tako po mehanizmih odpornosti proti karbapenemom kot po naboru virulenčnih dejavnikov)
- le manjši delež odpornosti proti karbapenemom bo posredovan z izločanjem karbapenemaz in te se bodo kot mehanizem odpornosti pojavljale pri večkratno odpornih sevih
- pojavljale se bodo predvsem karbapenemaze iz skupine VIM, ki jih sicer opisujejo tudi v bližnjih državah

2 PREGLED OBJAV

2.1 Bakterija *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je po Gramu negativna, v naravi vseprisotna bakterija. Glede pogojev rasti je nezahtevna auksotrofna bakterija (13), ki kot vir ogljika lahko uporablja različne substrate. Je prvenstveno aerobna bakterija, vendar lahko raste tudi v anaerobnih pogojih, kjer kot končni akceptor elektronov namesto kisika služi dušik (denitrifikacija). Uspeva v temperaturnem območju od 4 do 42 °C, pri pH od 4 do 8 (14, 15).

Velik in raznolik genom bakteriji *P. aeruginosa* omogoča, da se prilagaja tako spremembam v okolju (različna hranila, odpornost na zunanje vplive) kot tudi različnim gostiteljem (3, 16, 17). Spekter gostiteljev, ki jih *P. aeruginosa* lahko kolonizira oz. okuži, sega od enoceličnih organizmov, preko rastlin in živali do človeka (18). Zaradi njene vseprisotnosti v okolju z bakterijo *P. aeruginosa* pogosto pridemo v stik, vendar zdravega gostitelja le redko kolonizira. Pogosteje pride do gastrointestinalne kolonizacije pri hospitaliziranih bolnikih, kjer ta znaša od 2–24 % (19). Pogosto kolonizira tudi dihala pri kronično bolnih (cistična fibroza, kronična obstruktivna pljučna bolezen - KOPB).

S kliničnega stališča je zelo pomembna prirojena in pridobljena odpornost *P. aeruginosa* proti številnim antibiotikom, kar otežuje zdravljenje okužb (3). Odpornost proti zdravilom in razkužilom omogoča *P. aeruginosa*, da je eden najpogostejših povzročiteljev okužb povezanih z zdravstvom (20).

2.2 Klinični pomen bakterije *P. aeruginosa*

Bakterija *P. aeruginosa* je najpogostejši oportunistični patogen, ki zelo redko povzroča okužbe zdravih tkiv. Večina hujših okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa* je povezana z zdravljenjem in potekajo kot akutne in kronične okužbe dihal, sečil in sistemske okužbe (21, 22, 23). Najpogostejše skupine bolnikov pri katerih se razvijejo okužbe s *P. aeruginosa* so: nevtropenični bolniki, bolniki s hujšimi opeklinami, bolniki s cistično fibrozo, bolniki na enotah intenzivnega zdravljenja, novorojenci in ostareli (1, 24). Sistemske okužbe s *P. aeruginosa* spremlja visoka smrtnost, 17–44 % (25, 26, 27). Najpogostejše okužbe in njihove povezave z dejavniki tveganja prikazuje tabela 2.1.

Tabela 2.1. Najpogostejše okužbe, ki jih povzroča bakterija *P. aeruginosa* in njihova povezanost z dejavniki tveganja (povzeto po referenci (28)).

Mesto okužbe	Klinična slika	Pogostnost	Najpomembnejši dejavniki tveganja
Dihala	akutna pljučnica	zelo pogosto	hospitalizacija; intenzivne enote; umetno predihavanje; nevtropenični bolniki; imunosupresivno zdravljenje
	kronične okužbe spodnjih dihal	zelo pogosto	cistična fibroza KOPB; bronhiektazije
Kri	bakteriemija; sepsa	zelo pogosto	dolgotrajna bolnišnična oskrba; katetri; širokospektralni antibiotiki; nevtropenični bolniki; AIDS; sladkorna bolezen; opekline
Sečila	akutne in kronične okužbe	zelo pogosto	prisotnost tujkov; katetri; operativni posegi; obstrukcije
Uho	vnetje zunanega sluhovoda;	zelo pogosto	plavanje
	maligno vnetje zunanega sluhovoda; kronično gnojno vnetje srednjega ušesa		sladkorna bolezen
Koža in mehka tkiva	dermatitis	relativno pogosto	kopališča
	okužbe ran		poškodba
	okužbe opeklinskih ran		opeklinske rane
	pyoderma, folliculitis		
	Echtyma gangrenosa		nevtropenični bolniki
Oko	keratitis	pogosto	zaplet po poškodbi; kontaktne leče
	oftalmija pri novorojenčkih	redko	starost
Osrednje živčevje	meningitis, možganski absces	redko	poškodbe glave, nevrokirurški posegi
Okužbe kosti in sklepov	osteomielitis	redko	travma
Srčno žilni sistem	endokarditis	redko	i.v. narkomani
Prebavila	nekrotizirajoči enterokolitis perirektalne okužbe	redko	nedonošenčki (+parenteralna prehrana); nevtropenija

2.3 Mehanizmi odpornosti pri bakteriji *P. aeruginosa*

Zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa* je težavno, saj je bakterija že intrinzično odporna proti številnim protimikrobnim zdravilom. To je predvsem posledica slabe prepustnosti zunanje celične membrane (3). Intrinzična odpornost prizadene protimikrobna zdravila iz različnih antibiotičnih razredov. Tako je *P. aeruginosa* odporen proti številnim betalaktamskim antibiotikom, kloramfenikolu, kombinaciji trimetoprima s

sulfometaksazolom, tetraciklinom, makrolidom in večini kinolonov (3, 29). Intrinzičnim dejavnikom odpornosti se lahko pridružijo še adaptivni in pridobljeni dejavniki odpornosti, kot so povečano črpanje protimikrobnega zdravila iz bakterijske celice in encimatska razgradnja ali sprememba zdravila (1, 3, 30) (Tabela 2.2). Zato je za zdravljenje na voljo le omejen nabor zdravil, med njimi so: protipsevdomonasni penicilini (ureidopenicilini in alfakarboksipenicilini), protipsevdomonasni penicilini z inhibitorji betalaktamaz (piperacilin s tazobaktamom), protipsevdomonasni cefalosporini III. (ceftazidim, cefoperazon) in cefalosporini IV. generacije (cefepim), protivsevdomonasni cefalosporini z inhibitorji betalaktamaz (ceftolozan s tazobaktamom, ceftazidim z avibaktamom), karbapenemi (imipenem, meropenem, doripenem), fluorokinoloni (ciprofloksacin, levofloksacin), aminoglikozidi v kombiniranem zdravljenju, ter polimiksini (polimiksin B, kolistin) (25, 27, 28).

2.3.1 Odpornost proti karbapenemom pri bakteriji *P. aeruginosa*

Karbapenemi sodijo v skupino betalaktamskih protimikrobnih zdravil s širokim spektrom delovanja. Nekritična uporaba karbapenemov pospešuje pojav proti njim odpornih sevov *P. aeruginosa* (31).

Odpornost *P. aeruginosa* proti karbapenemom je lahko posredovana na več načinov. Lahko je posledica sočasnega delovanja večih mehanizmov, tako npr. aktivnosti psevdomonasnih cefalosporinaz – PDC (angl. Pseudomonas-derived cephalosporinases - PDC) ob istočasni aktivnosti izlivnih črpalk, ki izločajo karbapeneme iz celice (32). Pogosto je vzrok izguba porina OprD v zunanji membrani in posledično pojav odpornosti proti imipenemu (33). Za to vrsto odpornosti je značilno, da je ohranjena občutljivost za druge betalaktamske antibiotike, ki so sicer učinkoviti proti *P. aeruginosa* (31).

Vse pogosteje opažamo odpornost proti karbapenemom, ki jo posredujejo encimi iz molekularnega razreda skupine B, tako imenovane metalo-betalaktamaze – MBL (angl.: metallo-beta-lactamase – MBL) (34). Za te je značilno, da učinkovito razgradijo vse betalaktame, razen monobaktamov (aztreonam) (35). Geni, ki nosijo zapis zanje, so nameščeni kot kasete v integronih, kar jim omogoča učinkovito izražanje in širjenje (36, 37). Med po Gramu negativnimi bacili je znanih več tipov MBL, pri *P. aeruginosa* sta najpogostejša tipa IMP (angl.: imipenemase – IMP) in VIM (angl.: Verona integron-encoded metallo- β -lactamase – VIM), pojavljajo se pa še drugi, kot npr. GIM (angl.: Germany imipenemase – GIM) in SPM (angl.: Sao Paulo metallo- β -lactamase – SPM) (36, 38, 39).

2.3.2 Odpornost proti drugim betalaktamom pri bakteriji *P. aeruginosa*

Poleg zmanjšane prepustnosti igrajo pomembno vlogo pri odpornosti proti betalaktamom (razen karbapenemom) različne PDC, med njimi tudi AmpC, ki je podobna kromosomalni obliki AmpC pri nekaterih enterobakterijah (40). Divji tipi *P. aeruginosa* izločajo nizke bazalne nivoje AmpC, zato so občutljivi za protipsevdomonasne peniciline, za kombinacije le-teh z inhibitorji betalaktamaz, za cefalosporine in za karbapeneme. Če se tvorba AmpC poveča, pa se pojavi odpornost proti vsem betalaktamom, razen karbapenemom. Čezmerna tvorba AmpC sama ne vpliva na občutljivost za karbapeneme, domnevajo pa, da lahko prispeva svoj delež ob hkrati prisotnih drugih dejavnikih odpornosti (40).

Tabela 2.2: Mehanizmi odpornosti na protimikrobna zdravila pri bakteriji *P. aeruginosa*

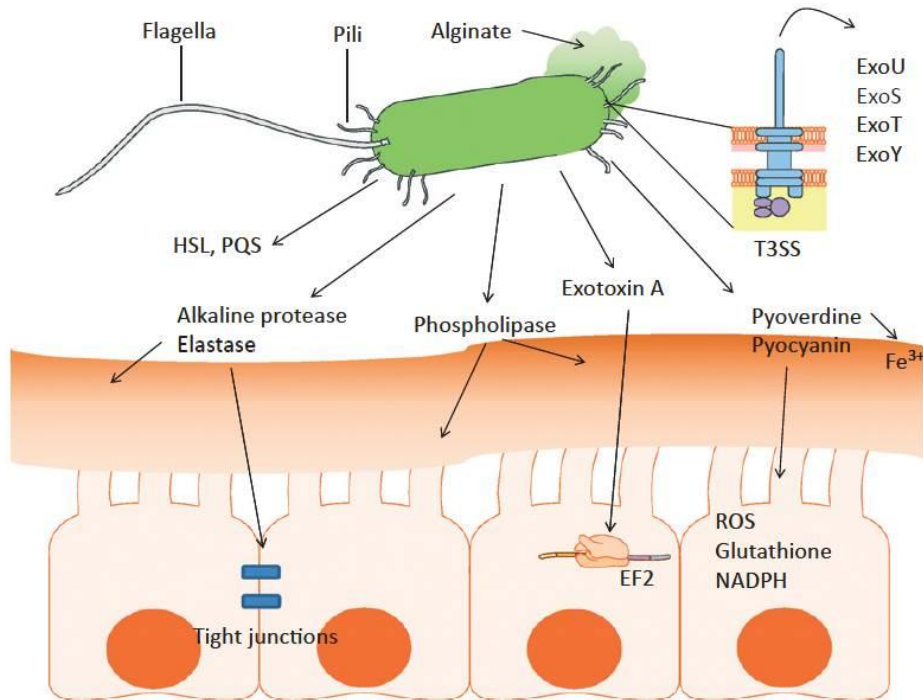
Vrsta odpornosti	Mehanizem	Primeri
Intrinzična odpornost	izlivne črpalke	MexAB-OprM; MexCD-OprJ; MexEF-OprN; MexXY-OprM (izločajo cefalosporine, karbapeneme, aminoglikozide, kinolone, ureidopeniciline)
	prepustnost zunanje membrane	OprF, OprD, OprB (zmanjšana prepustnost za karbapeneme, aminoglikozide, kinolone)
	inducibilne kromosomalne betalaktamaze	AmpC – (penicilini, nekateri cefalosporini); izločanje inducibilno
Adaptivna odpornost	spremembe v membrani	Spremembe lipida A (aminoglikozidi, polimiksini)
	povečano izločanje intrinzičnih betalaktamaz	Povečana sinteza AmpC in stalno izločanje
Pridobljena odpornost	mutacija na nivoju tarče ali regulatornih proteinov intrinzične odpornosti	DNA-giraza, Dna-topoizomeraza (kinoloni) MexZ (kinoloni, aminoglikozidi)
	sprememba antibiotika – beta laktamaze	ESBL; MBL; (penicilini, cefalosporini, karbapenemi)

(prirejeno po referencah: 1, 3); ESBL = betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (*angl.*: extended spectrum beta-lactamase – ESBL), MBL= metalo-betalaktamaze (*angl.*: metallo beta-lactamase – MBL).

Delež odpornih izolatov med sevi *P. aeruginosa* se na splošno viša (41). V Sloveniji sicer opazamo, da se je odpornost *P. aeruginosa* proti karbapenemom od leta 2014 do 2016 celo nekoliko znižala. Leta 2014 je znašal delež sevov *P. aeruginosa*, ki so bili neobčutljivi za imipenem ali meropenem 12 oz. 17 % (42), leta 2016 pa se je delež neobčutljivih sevov znižal za imipenem na 11,5 % oz. za meropenem na 11,3 % (43). Leta 2014 so v Evropi med invazivnimi sevi ugotovili prisotnost proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* v deležu od 4,4 (Nizozemska) do 58,5 % (Romunija). V Sloveniji je delež proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* med invazivnimi sevi leta 2014 znašal 31,3 % (44), leta 2017 pa se je le-ta znižal in je znašal 17,4 %. (45).

2.4. Virulenčni dejavniki pri bakteriji *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ima kot oportunistični patogen številne lastnosti, ki omogočajo kolonizacijo in okužbo dovzetnega gostitelja (Slika 2.1). Poenostavljeno jih lahko razdelimo na dejavnike pomembne za kolonizacijo, in dejavnike, ki škodljivo delujejo na tkiva gostitelja. Pogosto pa se učinki teh dejavnikov prepletajo (Tabela 2.3).



Slika 2.1.: Virulenčni dejavniki pri bakteriji *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* izloča številne dejavnike virulence. Biček (flagellum) in pilusi tipa IV (pili type IV) so poglavitni adhezini, ki se vežejo na gangliozide gostiteljskih celic (asialo GM1 in asialo GM2). Ti adhezini skupaj z lipopolisaharidom (LPS) povzročajo izločanje vnetnih mediatorjev. Ko se med *P. aeruginosa* in gostiteljsko celico vzpostavi stik, se aktivira sekrecijski sistem tipa 3 – T3SS (*angl.*: Type III secretion system - T3SS), s pomočjo katerega se citotoksini vbrizgajo neposredno v citosol gostiteljske celice. Različni virulenčni dejavniki, ki jih izloča *P. aeruginosa*, učinkujejo na celice in tkiva gostitelja. Tako različne proteaze razgrajujejo komponente komplekta, mucin, razkrajajo tesne stike med epitelijskimi celicami (na sliki *angl.*: tight junction – tesni stiki) in na tak način prispevajo k širjenju v gostitelju. Lipaze in fosfolipaze razkrajajo lipide v celičnih membranah gostiteljskih celic in lipide, ki so sestavni del surfaktanta (snovi, ki zmanjšuje površinsko napetost v pljučnih mešičkih). Piocianin vpliva na elektronski transport in tvorbo reaktivnih kisikovih intermediatov. Pioverdin omogoča bakteriji, da si prisvoji Fe ione iz zalog gostitelja. (Povzeto po referenci: 1)

Tabela 2.3: Virulenčni dejavniki bakterije *P. aeruginosa*

		Dejavniki pomembni za kolonizacijo			Učinek na celice in tkiva			drugo
		adhezin	zaščita pred odg. gostitelja	giblјivost/k emotaksija	izločanje vnetnih mediatorjev	način izločanja	toksin	
Strukturne značilnosti	Alginat	++	+++			-		biofilm
	LPS	++	+++		+++	-	endotoksin	
	Pilusi tipa IV	+++		+++		-		mikrokolonije
	Biček	++		+++	+++	-		
	Sekrecijski sist.					-		izločanje encimov/toksinov
Pigmenti	Piocianin		++		++	PD		oksidativni stres; apoptoza nevtrofilnih leukocitov in makrofagov
	Pioverdin					PD		siderofor; regulacija tvorbe eksotoksina A in endoproteaze
Encimi/toksini	Alkalna proteaza		++			T1SS		razgradnja komplemента in dibronektina
	Proteaza IV							razgradnja tkiv in beljakovin
	Elastaza		++		+++	T2SS		razgradnja komplemента, tkiv in beljakovin; biofilm
	Eksotoksin A				+++	T2SS	eksotoksin ADRPT	
	Fosfolipaze		+++		+++	T2SS		razgradnja cel. membran, tkiv; pridobivanje fosfata
	ExoS		+++		+++	T3SS	bifunkcionalni eksotoksin	aktivacija GTP-az
	ExoT		+++		+++	T3SS	bifunkcionalni eksotoksin	razgradnja cel. membran, tkiv;
	ExoU		+++		+++	T3SS	fosfolipaza A2	apoptoza; razgradnja epitelija
	ExoY							adenilat ciklaza
Črpalke	MDR izločevalni sistemi							odpornost proti antibiotikom
Regulatorni mehanizmi	Qurum sensing							aktivacija genov pomembnih za virulenco

PD = pasivna difuzija; T1SS = sekrecijski sistem tipa I (*angl.*: Type I secretion system – T1SS); T2SS = sekrecijski sistem tipa II (*angl.*: Type II secretion system – T2SS); T3SS = sekrecijski sistem tipa III (Type III secretion system – T3SS).

Alginat

Alginat je eksopolisaharid, ki obdaja celice *P. aeruginosa* in se izloča predvsem pri kronično potekajočih okužbah (mukoidni sevi), ki so povezane s cistično fibrozo ali KOPB. Domnevajo, da sodeluje pri tvorbi biofilma in ščiti bakterijske celice pred obrambnimi mehanizmi gostitelja, ter učinkovanjem protimikrobnih zdravil (1).

Lipopolisaharid

Lipopolisaharid (LPS) je kompleksni glikolipid, ki je strukturna komponenta celične stene po Gramu negativnih bakterij. Sestavljajo ga lipid A, osrednji oligosaharid in O-antigen. Na osnovi O-antigena seve *P. aeruginosa* razdelimo v 20 serotipov (46). LPS se veže na receptorje gostiteljskih celic in je pomemben kot adhezin. Podobno kot pri drugih po Gramu negativnih bakterijah z vezavo na imunske celice sproži izločanje vnetnih citokinov, ki lahko privedejo do septičnega šoka (1).

Pilusi tipa IV

Najpomembnejši adhezin bakterije *P. aeruginosa* so polarno nameščeni pilusi tipa IV. To so proteinske strukture s pomočjo katerih se bakterija pritrjuje na celice in tudi na nežive površine (1). Poleg tega omogočajo *P. aeruginosa* ciljano gibanje na trdih in poltrdnih površinah - "trzajoča" gibljivost (*angl.*: twitching motility) proti okolju, ki vsebuje hranila (47). Skupaj z bičkom so pomembni za gibljivost v tekočem okolju, za tvorbo biofilma in za tvorbo mikrokolonij (1).

Bički (Flagele)

Celica *P. aeruginosa* ima posamičen biček, ki je nameščen polarno. S pomočjo bička se bakterija giblje skozi tekoče okolje – roječe gibanje (*angl.*: swarming motility). Biček ima tudi funkcijo adhezina, veže se na glikolipide epiteljskih celic in stimulira izločanje vnetnih mediatorjev (1).

Poleg zgoraj navedenih virulenčnih dejavnikov, ki so pritrjeni na bakterijske celice so za patogenezo psevdomonasnih okužb pomembni tudi virulenčni dejavniki, ki jih bakterija izloča. Nekateri, kot sta pigmenta piocianin in pioverdin, prehajajo v okolico celice s pasivno difuzijo, druge virulenčne dejavnike pa bakterija aktivno izloča preko sekrecijskih sistemov tipa I, II in III.

Piocianin

Piocianin je fenazinski pigment, ki značilno obarva kolonije *P. aeruginosa* na nekaterih

gojiščih, izražen je pri več kot 90 % izolatov (48). Povzroča oksidativne poškodbe na gostiteljskih celicah, tako da reagira s kisikom in pospešuje nastajanje superoksida ter vodikovega peroksida. Zavira tudi elektronski transport v mitohondrijih (1, 48). Tako povzroča apoptozo nevtrofilcev in inhibira delovanje makrofagov, ter zavira rast drugih bakterijskih celic (49). Pri okužbah dihal poškoduje tkivo tako, da vpliva na transport ionov, moti izločanje sluzi in zmanjšuje delovanje migetalčnih celic (48).

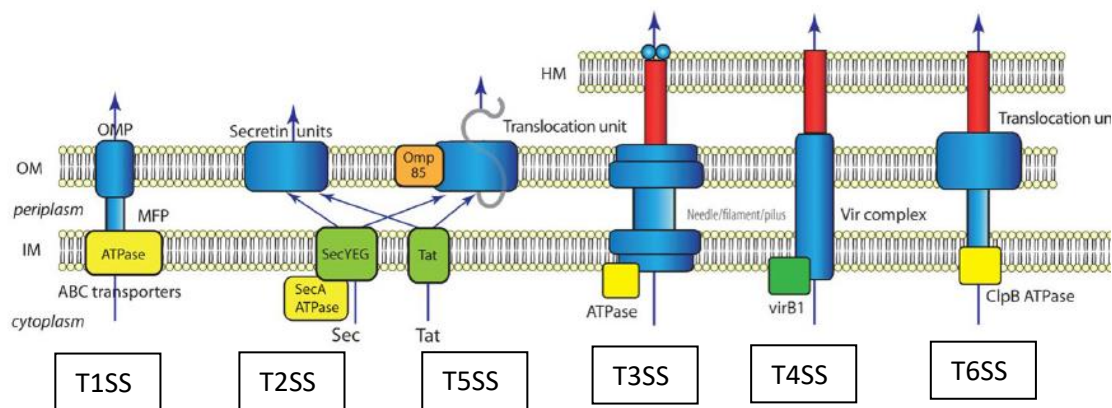
Pioverdin

Poleg piocianina *P. aeruginosa* izloča še druge pigmente, od teh je najpomembnejši pioverdin, ki deluje kot siderofor – iz okolice veže železo, ki ga pridobi iz zalog gostitelja. Poleg tega deluje tudi kot signalna molekula in vpliva na regulacijo tvorbe eksotoksina A in endoproteaze (50).

Sekrecijski sistemi

Po Gramu negativne bakterije uporabljajo za aktivno izločanje beljakovin več različnih sekrecijskih sistemov, ki jih razdelimo v dvostopenjske in enostopenjske (Slika 2.2).

Pri dvostopenjskih sekrecijskih sistemih se v prvi stopnji beljakovine prenesejo skozi notranjo celično membrano v periplazmatski prostor in nato v drugi stopnji skozi zunanjo celično membrano. Med dvostopenjske sekrecijske sisteme uvrščamo T2SS in T5SS (*angl.*: Type V secretion system – T5SS). Na tak način se pri *P. aeruginosa* prenašajo iz celice elastaze, eksotoksin A in večina lipaz in fosfolipaz. Druga skupina sistemov za izločanje proteinov pa združuje enostopenjske sisteme: T1SS, T3SS, T4SS in T6SS (*angl.*: Type VI secretion system - T6SS). (51, 52). Pri *P. aeruginosa* se s T1SS izloča alkalna proteaza v okolje bakterijske celice, s T3SS pa se izločajo virulenčne beljakovine ExoS, ExoU, ExoT in ExoY neposredno v citoplazmo gostiteljskih celic.



Slika 2.2: Transportni sistemi pri po Gramu negativnih bakterijah. T1SS (*angl.*: Type I secretion system – T1SS), T3SS (*angl.*: Type III secretion system – T3SS), T4SS (*angl.*: Type IV secretion system – T4SS) in T6SS (*angl.*: Type VI secretion system – T6SS) so enostopenjski sekrecijski sistemi. Vsi navedeni, razen T1SS, transportirajo efektorske beljakovine neposredno v gostiteljsko celico. T2SS (*angl.*: Type II secretion system – T2SS) in T5SS (*angl.*: Type V secretion system – T5SS) sta dvostopenjska sekrecijska sistema.

HM=membrana gostiteljske celice; OM=zunanja membrana po gramu negativnih bakterij; IM=notranja membrana po Gramu negativnih bakterij; OMP=beljakovine zunanje membrane; ATP-aze in šaperoni so obarvani rumeno; (Prirejeno po referenci: 52)

Sekrecijski sistem tipa 3 (T3SS) in efektorske beljakovine

T3SS najdemo izključno pri po Gramu negativnih bakterijah, povezan je z virulenco in omogoča enostopenjski transport proteinov skozi notranjo in zunanjo celično membrano neposredno v citoplazmo celice gostitelja. Pogosto služi za izločanje dejavnikov virulence (51).

T3SS pri *P. aeruginosa* prikazuje slika 2.3. Funkcionalno ga razdelimo v 5 komponent: igelni kompleks (*angl.*: injectisome), aparat za translokacijo, regulatorni proteini, efektorski proteini in šaperoni. Vseh 5 komponent nadzorovano sodeluje, rezultat je vbrizganje efektorskih proteinov v gostiteljsko celico (53, 54). Igelni kompleks, ki ga sestavlja 20 ali več beljakovin, po strukturi spominja na bičke in deluje kot translokacijski kanal.

Za uspešno vbrizgavanje efektorjev je potreben proteinski translokacijski aparat. Komponente tega aparata se prenesejo po translokacijskem kanalu in po stiku z membrano gostiteljske celice tvorijo v njej poro premera 2,8–6 nm (53). Že sam nastanek pore lahko povzroči smrt gostiteljske celice.

omogoči bakteriji lažje prodiranje v tkivo. Zavira delovanje celic imunskega odziva, kar omogoča boljše preživetje *P. aeruginosa*. ExoS bi naj bil najpomembnejši citotoksin, ki sodeluje pri kolonizaciji, invazivnosti in razsoju okužbe (56, 57).

ExoT

ExoT ima podobno aktivnost kot ExoS, s katerim ima 76% homologno aminokislinsko zaporedje. Razlika je v tem, da ExoT ADPRT aktivnost ribozira manjše število drugih gostiteljskih beljakovin kot ExoS.

ExoT pomembno inhibira fagocitozo in vpliva na razgradnjo epitelija, kar omogoča razsoj okužbe (53).

ExoU

ExoU je fosfolipaza A₂ s širokim spektrom substratov, ki vključuje fosfolipide, lizofosfolipide in nevtralne lipide. Povzroča hitro celično smrt, učinkuje na fagocite in epitelij.

ExoY

ExoY je adenilatna ciklaza, povzroča zvišanje znotrajceličnega nivoja cikličnega AMP in preko tega izražanje številnih genov. Pride do sprememb v strukturi citoskeleta, zaviranja fagocitoze in povečane prepustnosti endotela (53).

Exotoksini, ki se izločajo preko T3SS, so različno prisotni pri različnih sevih. To je lahko posledica različnega izražanja genov, ki nosijo zapis zanje, ali pa tudi odsotnosti genov za določeno efektorsko beljakovino. Tako ugotavljajo, da bi naj bili sevi, ki izločajo ExoU predvsem citolitični, tisti, ki izražajo ExoS pa predvsem invazivni (58).

Proteaze

P. aeruginosa izloča več različnih vrst proteaz, ki so pomembne za patogenezo, ker razgrajujejo fibrin, tesne stike med celicami in imunoglobuline ter druge proteine (1).

Najbolj raziskana je alkalna proteaza, ki je s cinkom povezana metaloproteaza. Je edini virulenčni dejavnik, ki ga *P. aeruginosa* izloča s pomočjo T1SS. K virulenci prispeva z razgradnjo komponent komplemента in fibronektina (59).

Elastaze

P. aeruginosa tvori dve elastazi (A in B). Njuno izločanje, ki poteka preko sekrecijskega sistema tipa II, je uravnava z LasI quorum sensing – QS (*angl.*: quorum sensing – QS) sistemom. Večino aktivnosti prispeva elastaza B - najmočnejši proteolitični encim, ki ga izloča *P. aeruginosa*. Deluje invazivno, tako da razgrajuje tkiva, in imunomodulatorno, tako da razgrajuje pomembne molekule udeležene v imunskem odgovoru, kot so komponente komplemента, protitelesa, inhibitor proteinaze alfa 1, kolagen, fibrin in elastin (60, 61). Sodeluje tudi v začetnih stopnjah nastajanja biofilma (61).

Proteaza IV

je serinski proteolitični encim, ki razgrajuje komponente komplemента, fibrinogen in imunoglobuline, izločanje poteka verjetno preko sekrecijskega sistema tip 2 (62).

Eksotoksin A

Eksotoksin A uvrščamo med AB toksine, ki so sestavljeni iz dveh podenot, podenota A je pomembna za encimsko aktivnost toksina, podenota B pa za vezavo na specifične membranske receptorje na celici. Aktivirana podenota A je ribozil transferaza (ADPRT). Po vstopu v celico katalizira prenos riboze iz ADP na elongacijski dejavnik-2 (*angl.*: elongation factor-2 – EF-2) in na tak način inhibira sintezo beljakovin. Podoben način delovanja, vendar različne tarče imajo tudi AB toksini drugih bakterij, npr.: *S. aureus*, *C. diptheriae*, *C. botulinum* (63, 64).

Fosfolipaze

Fosfolipaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo fosfolipidov. Glede na mesto razgradnje fosfolipida jih razdelimo v skupine A do D (65). Razgrajujejo celične membrane in tkiva in so pomembne za pridobivanje fosfata. Kot virulenčni dejavnik se pojavljajo pri različnih vrstah bakterij, med njimi *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa* (66).

Med pomembnejšimi fosfolipazami, ki jih tvori *P. aeruginosa* so fosfolipaze C (hemolitična in nehemolitična) in fosfolipaza A2.

Od fosfolipaz C je pomemben virulenčni dejavnik hemolitična fosfolipaza C (66). Razgradni produkti fosfolipazne aktivnosti aktivirajo tvorbo leukotrienov, prostaglandinov in tromboksanov, ki stimulirajo vnetni odgovor (67). Povezujejo jo tudi z adherenco na epiteljske celice in citotoksičnostjo (66).

Fosfolipazo 2A poznamo tudi pod imenom eksotoksin U (ExoU). Za razliko od fosfolipaz C, ki se izločata z T2SS, se ExoU izloča z T3SS in je bila opisana v enem od prejšnjih odstavkov/razdelkov.

Quorum sensing in tvorba biofilma

Quorum sensing (QS) je mehanizem, ki omogoča koordinirano adaptacijo bakterijske populacije na spremembe v okolju. Adaptacijo posredujejo majhne difuzibilne molekule, ki jih imenujemo signalne molekule (avtoinducerji). Te konstitutivno tvorijo vse bakterijske celice v populaciji. Koncentracija avtoinducerja v okolju je sorazmerna s količino bakterij. Ko gostota bakterijske populacije doseže kritično vrednost (t.i. quorum), je koncentracija avtoinducerja dosegla prag in sproži aktivacijo genov, ki se izrazi kot koordinirani odgovor v celotni bakterijski populaciji (1). Pri *P. aeruginosa* so znani 3 QS sistemi – to so sistem las, sistem rhi in kinolonski QS sistem (68, 69). Urejeni so hierarhično in so vpleteni v nadzor dejavnikov virulence, preživetja celice in tvorbe biofilma.

Biofilmi so visoko organizirane bakterijske združbe, pri katerih so bakterije pritrjene na površino in med seboj ter vključene v izvenselično polimerno substanco - matriks, ki ga sestavljajo polisaharidi, nukleinske kisline, lipidi in beljakovine. Matriks predstavlja 50–90% volumna biofilma in nudi bakterijski združbi fizikalno in kemično zaščito (70, 71). Tvorba biofilma še dodatno oteži zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*. Za nastanek biofilma in prehajanje bakterij nazaj v planktonsko obliko je poleg QS potrebno sodelovanje še drugih regulacijskih sistemov (1).

2. 5 Bakterija *P. aeruginosa* v izvenbolnišničnem in bolnišničnem okolju

V naravi bakterijo *P. aeruginosa* najdemo v različnih, zlasti vlažnih okoljih, bodisi prosto živečo ali povezano z nekaterimi vrstami ameb (72). Osamili so jo iz sladke, morske in bazenske vode, iz vodovodnih sistemov in odpadnih vod, iz odplak, prsti, iz gnijočih materialov in iz drugih okoljskih vzorcev (18, 73).

Odpornost proti razkužilom, antiseptikom, protimikrobnim zdravilom in sposobnost tvorbe biofilma bakteriji *P. aeruginosa* omogoča uspevanje v bolnišničnem okolju. Tu jo osamimo v povezavi z vodnimi viri (vodovodna napeljava, odtoki), pa tudi iz razkužil, opreme za umetno predihavanje, blazin, endoskopov, instrumentov za aspiracijo (74).

Številni strokovni članki kažejo na povezavo okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa* z zunanjimi viri v bolnišničnem okolju. Okužbe se lahko širijo posredno ali neposredno s kontaminirano vodo. Tako so jih opisali v povezavi s kontaminiranimi vodnimi pipami, pitno vodo, vodovodnimi odtoki, ustekleničeno vodo, stekleničkami za hranjenje, vodnimi kopelmi, raztopinami antiseptikov, z vlažilci zraka ob umetnem predihavanju, medicinskim priborom in kontaminiranimi predmeti, ter tudi preko rok medicinskega osebja (12, 13, 24, 74, 75, 76, 77, 78, 79).

Tudi v Sloveniji smo v strokovni literaturi opisali dva izbruha, ki jih je povzročil proti karbapenemom odporen *P. aeruginosa*, in sicer v letih 2011 do 2013 v UKC Ljubljana (80) in v letih 2012–2013 v UKC Maribor. V drugem primeru smo dokazali povezavo med okuženimi bolniki in kontaminiranimi vodnimi odtoki (81).

2.6 Metode tipizacije bakterije *P. aeruginosa*

2.6.1 Pregled molekularnih tipizacijskih metod

Tipizacija je postopek s katerim ugotavljamo podobnost, sorodnost oz. povezanost med bakterijskimi izolati znotraj določene vrste (82). S tipizacijami lahko dokazujemo izvor in prenos okužbe, opredelimo seve, ki imajo večjo možnost prenosa oz. večjo sposobnost povzročanja okužbe, ter preučujemo strukturo in dinamiko mikrobne populacije (83). Tipizacijske metode v osnovi razdelimo na starejše fenotipske tipizacijske metode in novejše molekularne tipizacijske metode.

Molekularne tipizacijske metode v primerjavi s klasičnimi tipizacijskimi metodami odlikuje zlasti večja razlikovalna moč in univerzalnost, omogočajo bolj natančno opredelitev povezanosti izolatov in z njimi lahko tipiziramo širši spekter bakterijskih vrst. V primerjavi s klasičnimi tipizacijskimi metodami so običajno tudi hitrejše (84).

Pri izbiri ustrezne tipizacijske metode moramo upoštevati njene značilnosti. Dobre tipizacijske metode imajo visoko razlikovalno moč in ponovljivost, so univerzalne – omogočajo tipizacijo širokega nabora različnih bakterijskih vrst, enostavne za uporabo, hitre in cenovno dostopne (82, 83). Na izbor tipizacijske metode vpliva tudi problematika, ki jo želimo s tipizacijo razrešiti. Z molekularnimi tipizacijskimi metodami lahko npr. želimo dokazati genetsko povezanost med izolati skozi daljši čas – dolgoročne epidemiološke študije ali pa skozi krajše časovno obdobje ob izbruhih oz. epidemijah (85).

Metode, ki jih uporabljamo za molekularno tipizacijo lahko razdelimo v tri skupine (86, 87):

1.) metode, ki temeljijo na prikazu fragmentov DNK (Tabela 2.4),

2.) metode, ki temeljijo na hibridizaciji in

3.) metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja.

2.6.1.1 Metode, ki temeljijo prikazu fragmentov DNK

Pri teh metodah povezanost med izolati določamo na osnovi velikosti fragmentov DNK z gelsko ali kapilarno elektroforezo. Fragmente DNK dobimo tako da: a) DNK bodisi razrežemo z ustreznimi restrikcijskimi encimi, b) pomnožujemo odseke genomske DNK ali c) s kombinacijo teh dveh pristopov. S pomnoževanjem DNK dobimo veliko število kopij fragmentov, kar poveča občutljivost in hitrost metode (87). Metode primerjalno prikazuje Tabela 2.4. V naši raziskavi smo uporabili elektroforezo v pulzirajočem električnem polju, ki jo v besedilu podrobneje obravnavamo.

Tabela 2.4: Primerjava med metodami, ki temeljijo na prikazu fragmentov DNK (Prirejeno po Li, Raoult in Fournier, 2009).

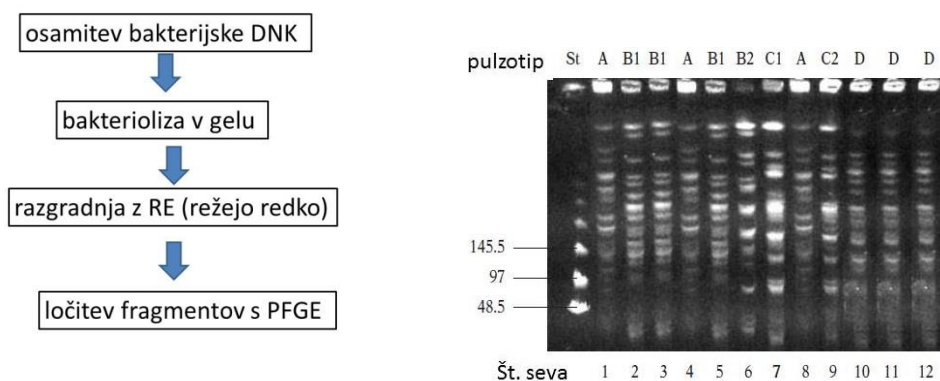
Metoda	Pogostnost rezanja DNK z RE	Uporaba amplifikacije	Velikost DNK fragmentov	Način prikaza
PFGE	redko	ne	veliki (>20 kb)	PFGE (gel)
RFLP	pogosto	ne	srednja (okoli 10 kb)	GE in hibridizacija
Ribotipizacija	pogosto	ne	srednja (okoli 10 kb)	GE in hibridizacija
PCR-RFLP	pogosto	da		GE
AFLP	dva RE	da	zelo mala (<1 kb)	GE ali CE
Rep-PCR	ni stopnje restrikcije	da	mala (<5 kb)	GE ali CE
RAPD	ni stopnje restrikcije	da	mala (<5 kb)	GE ali CE
MLVA	ni stopnje restrikcije	da	zelo mala (<1 kb)	GE ali CE

Legenda: PFGE = gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (*angl.*: Pulsed-field gel electrophoresis), RFLP = polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (*angl.*: Restriction fragment length polymorphism), AFLP = polimorfizem dolžin pomnoženih delov (*angl.*: Amplified fragment length polymorphism) RAPD = polimorfizem naključno pomnoženih fragmentov (*angl.*: Random amplification of polymorphic DNA), Rep-PCR = in vitro pomnoževanje repetitivnih zaporedij (*angl.*: Repetitive element palindromic PCR), PCR-RFLP = različica RFLP, ki ji predhodi pomnoževanje, MLVA= analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (*angl.*: Multiple-locus variable number tandem repeat analysis), CE=kapilarna elektroforeza (*angl.*: Capillary electrophoresis); RE=restrikcijski encim; GE=gelska elektroforeza,

Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju

Zlati standard med tipizacijskimi metodami za bakterije je gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju PFGE (*angl.*: Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE). Namenjena je ločevanju relativno velikih fragmentov DNK (10 kb do 10 Mb), kar nam omogoči uporaba

pulzirajočega električnega polja (88) (slika 2.4). Za izvedbo metode potrebujemo izolirano in očiščeno DNK, ki jo razrežemo z encimi – restrikcijskimi endonukleazami, ki imajo prepoznavna mesta dolga 6 ali več baznih parov. Uporabljamo encime, ki prepoznajo redka restrikcijska mesta, npr. restrikcijska endonukleaza *SpeI* (89). Izbira ustreznega restrikcijskega encima je pomemben dejavnik, ki vpliva na razlikovalno moč metode (87). Razrezano DNK prenesemo v gel in izvedemo elektroforezo v pulzirajočem električnem polju. Dobljene restrikcijske fragmente, ki se medsebojno ločijo na osnovi velikosti, prikažemo z uporabo etidijevga bromida. Dobimo za izolate značilne restrikcijske vzorce, ki jih lahko medsebojno primerjamo. Razlike v restrikcijskih vzorcih med posamičnimi izolati so posledica zamenjave, vstavitve ali delecije nukleotidov in izražajo polimorfizem DNK med restrikcijskimi mesti (85).



Slika 2.4: Prikaz PFGE: postopek in prikaz restrikcijskih fragmentov (prirejeno po referenci: 90).

Povezanost med posamičnimi izolati na osnovi makrorestrikcijskih vzorcev ugotavljamo na osnovi kriterijev, ki jih je objavil Tenover s sodelavci (82) (Tabela 2.5). Na ta način lahko izolate razporedimo v 4 skupine – nivoje.

Tabela 2.5: Tenoverjevi kriteriji za interpretacijo makrorestrikcijskih vzorcev, ki jih dobimo s PFGE.

Interpretacija – genetska povezanost med izolati	Število genetskih sprememb	Število različnih fragmentov
Genetsko neločljivi	0	0
Genetsko tesno povezani	1	2–3
Genetsko verjetno povezani	2	4–6
Genetsko nepovezani	3 ali več	7 ali več

PFGE je najpogosteje uporabljana metoda ob razjasnjevanju izbruhov (85, 91). Rezultat moramo vedno vrednotiti v sklopu širše slike, ki vključuje tudi epidemiološke podatke (87).

Metoda ima dobro razlikovalno moč, s pomočjo standardiziranih protokolov lahko dosežemo razmeroma dobro ponovljivost med laboratoriji. V primerih dobro standardiziranih PFGE metod obstajajo tudi podatkovne baze, ki so na voljo online. Največja od njih – PulseNet – spremlja 4 bakterijske vrste, ki povzročajo okužbe, ki se prenašajo s hrano: *E. coli* O157:H7, netifoidne vrste salmonel, šigele in *L. monocytogenes* (<http://www.pulsenetinternational.org/>). Izvedba PFGE je relativno zahtevna in dolgotrajna (3–4 ali več dni) (92, 93). Prenosljivost dobljenih podatkov je slabša kot v primeru metod, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja (94). Izvajanje same metode je cenovno ugodno, relativno visoki pa so zagonski stroški (85).

2.6.1.2 Metode, ki temeljijo na hibridizaciji

Tipizacijske metode temelječe na hibridizaciji DNK uporabljajo makro ali mikromreže, ki imajo na plastičnem, steklenem ali kovinskem nosilcu natančno razporejene DNK lovke (sonde) z znanim nukleotidnim zaporedjem (87). Lovke hibridizirajo z geni, ki označujejo (so markerji) določene bakterijske seve, oz. zaznajo vse alelne variante določenega gena, ki je prisoten pri vseh izolatih preiskovane bakterije. V mrežo je lahko vključeno od nekaj sto (makromreže) do nekaj tisoč in več lovk (mikromreže) (85). Z večanjem dostopnosti metod, ki temeljijo na določanju genomskih sekvenc le-te vse bolj nadomeščajo hibridizacijske metode.

2.6.1.3 Metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja

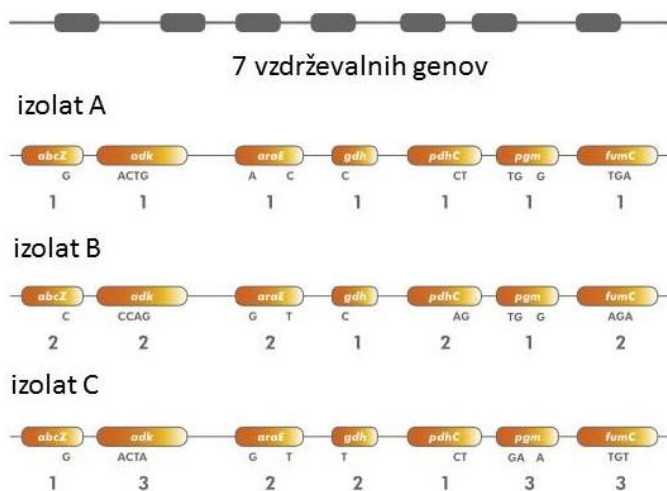
Za metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja – sekvenciranju, v osnovi uporabljamo dve tehniki, klasično Sangerjevo tehniko sekvenciranja (95), ki je počasna, relativno draga in z njo pridobimo dolge odčitke nukleotidnega zaporedja, ter sekvenciranje naslednje generacije (*angl.*: next generation sequencing – NGS), ki je veliko hitrejše, vendar pridobimo krajše odčitke DNK. Pri tretji tehniki, sistemih za sekvenciranje III. generacije, so rezultati že v obliki daljših odčitkov, njihova slabost je v tem, da imajo precejšnjo bralno napako. (96, 97, 98). Ti sistemi so tudi relativno dragi.

Z določanjem zaporedja nukleotidov v DNK lahko neposredno ločujemo med bakterijskimi sevi in sklepamo na njihovo sorodnost. Poglavitna prednost metod, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja v primerjavi z metodami, ki temeljijo na prikazu fragmentov DNK je v dobljenih podatkih. Pri določanju nukleotidnega zaporedja so ti nedvoumni in primerljivi med različnimi laboratoriji (87). Z določanjem nukleotidnega zaporedja lahko izvedemo tipizacijo na osnovi enega lokusa – SLST (*angl.*: single locus sequence typing, SLST), tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij – MLST (*angl.*: multilocus sequence typing, MLST) ali na

osnovi določanja nukleotidnega zaporedja celotnega genoma – WGS (*angl.*: whole genome sequencing, WGS) (85, 87, 99).

2.6.1.3.1 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij – MLST (*angl.*: multilocus sequence typing)

Med dobro standardizirane metode z odlično ponovljivostjo in dobro prenosljivimi rezultati sodi tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij – MLST. Z metodo ugotavljamo genetske variacije v nukleotidnem zapisu za vzdrževalne (*angl.*: house-keeping) gene, ki se zaradi svoje pomembne funkcije v času le malo spreminjajo (100). Metoda temelji na verižni reakciji s polimerazo, ki pomnoži odseke izbranih vzdrževalnih genov (običajno 7), tem pa nato določimo nukleotidno zaporedje. Po določitvi nukleotidnega zaporedja dobimo alelni profil izolata, ta predstavlja kombinacijo alelnih različic sekvenciranega gena. Iz alelnega profila določimo sekvenčni tip izolata – ST (*angl.*: sequence type – ST) (Slika 2.5.).

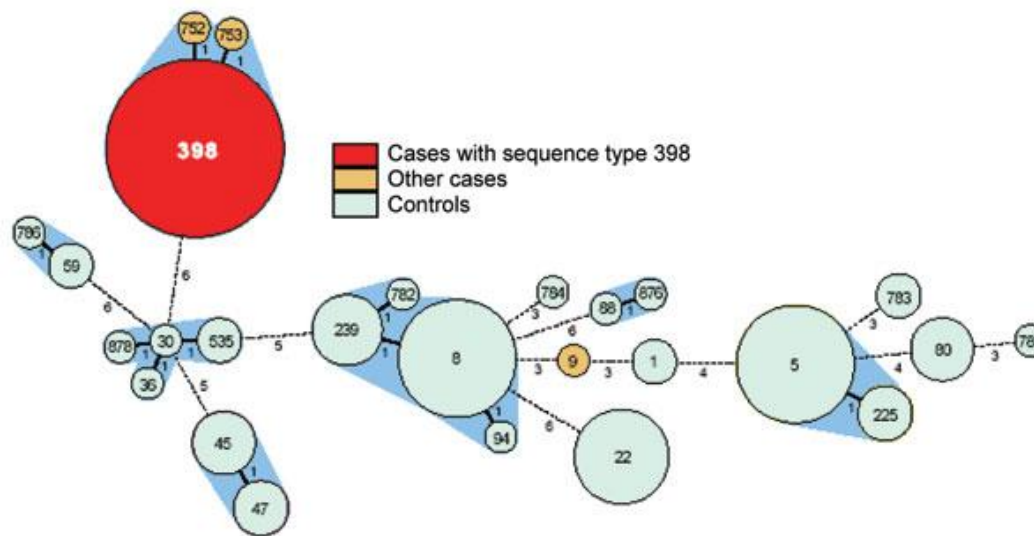


Slika 2.5: določitev ST izolata z metodo MLST; (prirejeno po <http://www.applied-maths.com/applications/mlst>).

Sheme MLST številnih organizmov so dostopne na spletnem naslovu <http://www.mlst.net>.

Prednost MLST pred drugimi tipizacijskimi metodami je v tem, da so rezultati enoznačni, upoštevajo mednarodno standardizirano nomenklaturu, so ponovljivi in jih dosežemo v kratkem času. (85, 101). Je dobro standardizirana, vrstno specifična metoda uporabna za tipizacijo številnih bakterijskih vrst (102, 103). Razmerje med izolati določimo s primerjavo alelnih profilov, sorodni izolati imajo enake oz. podobne ST, nesorodni pa različne ST. S pomočjo

računalniških algoritmov si lahko povezavo med izolati na osnovi MLST tipizacije prikažemo v obliki minimalno vpetega drevesa (99) (Slika 2.6.).



Slika 2.6: Minimalno vpeto drevo (*angl.*: minimum spanning tree) s katerim si lahko, s pomočjo računalniških algoritmov, prikažemo povezavo med izolati na osnovi MLST tipizacije. (99).

MLST ima dobro razločevalno moč in zaradi primerljivosti omogoča tudi sledenje širjenja klonov skozi čas in prostor, tako da je primerna za globalne epidemiološke, geografske in evlucijske raziskave širjenja izolatov in za študije molekularne evolucije patogenov. Slaba stran metode je visoka cena opreme in reagentov in zahtevnost izvedbe (visoko kvalificirano osebje) (85, 103).

Standardizirana shema za določanje ST *P. aeruginosa* temelji na določanju nukleotidnega zaporedja genov: *acsA*, *nuoD*, *trpE*, *mutL*, *guaA*, *aroE*, *ppsA* (100).

V naslednjem podpoglavju pa opisujemo izpopolnjene metode tipizacije MLST, ki temeljijo na uporabi celotnih genomskih sekvenc.

2.6.1.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma – WGS (*angl.* whole genome sequencing)

Za sekvenciranje celotnega genoma se uporabljajo metode NGS (87, 98, 104). WGS omogoča natančno identificiranje in hkrati opredeljevanje posamičnih bakterijskih izolatov. S sekvenciranjem celotnega genoma dobimo veliko število kratkih odčitkov (35–700 bp), ki jih z različnimi algoritmi sestavimo v celoten genom. Posebno težavo za odčitavanje in sestavljanje predstavljajo regije genoma z variabilnim številom tandemskih ponovitev – VNTR regije

(*angl.*: variable number tandem repeat – VNTR). Ključni problem pri WGS je tolmačenje velikega števila podatkov (85, 104). Metoda ima dobro razločevalno moč in ponovljivost, vendar je relativno draga, izvedbeno zahtevna in ne omogoča hitrega doseganja rezultatov.

Iz celotnega nukleotidnega zaporedja mikroorganizma dobimo podatke, ki so skladni z rezultati drugih molekularnih tehnik za tipizacijo, kot sta PFGE in MLST. Tako z WGS dobimo podatke o nukleotidnem zaporedju vzdrževalnih (»house keeping«) genov, na osnovi katerih lahko določimo sekvenčni tip – ST (*angl.*: sequence type – ST); mikroorganizma (105). Kadar za MLST uporabimo veliko genov iz genomskih sekvenc in ne samo 7 vzdrževalnih genov, govorimo o MLST+ tipizaciji, če uporabimo celoten skupni genom (*angl.*: core genome MLST - cgMLST) pa o cgMLST (106).

WGS v primerjavi z drugimi tipizacijskimi metodami (npr., MLST, PFGE) odlikuje izjemna natančnost in nam omogoča tipizacijo mikroorganizmov na nivoju sevov, ki jih lahko ločimo na osnovi polimorfizma posamičnih nukleotidov – SNP (*angl.*: single nucleotide polymorphism) (104). Kot kriterij za ločevanje klonalno sorodnih in nesorodnih sevov nam služi število SNP, ki jih iščemo znotraj osrednjega (*angl.*: core) genoma. To število je pri različnih vrstah bakterij različno. Za *P. aeruginosa* je kriterij še slabo poznan. Aktualne publikacije navajajo, da so sevi *P. aeruginosa* klonalno sorodni, če je razlika v številu SNP manjša ali enaka 37, kar je precej več kot pri večini drugih bakterij, kjer je meja za klonalno sorodne seve od 2 do 5 SNP (107).

Podatki celotnega genoma, ki jih dobimo pri WGS nam na osnovi poznavanja genov, ki posredujejo odpornost bakterijam proti protimikrobnim zdravilom, omogočajo predvidevanje odpornosti izolatov proti antibiotikom (104).

2.6.2 Uporaba molekularnih metod za tipizacijo *P. aeruginosa*

Za molekularno tipizacijo bakterije *P. aeruginosa* je na voljo več metod (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Najpomembnejše molekularne metode, ki se uporabljajo za tipizacijo *P. aeruginosa*

Metoda	Pomembnejše značilnosti	Izbor referenc
PFGE	-zlati standard -dobra razlikovalna moč -dobra intralaboratorijska, nekoliko slabša interlaboratorijska ponovljivost -relativno zahtevna izvedba -cenovno ugodna	(89, 86); številne druge objave (zlati standard za tipizacijo)
Ribotipizacija	-dobra razlikovalna moč -dobra ponovljivost -zahtevna izvedba	(108),
REP-PCR	-velika razlikovalna moč -hitra -cenovno ugodna -slabša ponovljivost	(91, 103).
MLVA	-velika razlikovalna moč (odvisna od izbora lokusov) -enostavna -hitra -dobra ponovljivost -ni univerzalna	(109)
MLST	-dobro standardizirana -zelo dobro ponovljiva -standardizirana nomenklatura – prenosljivost, določamo ST in CC. -ni univerzalna -visoka cena	(100, 110)
WGS	-dobra razločevalna moč -ponovljivost -dolgotrajna -zahtevna izvedba -visoka cena	(87)
Mikromreže	-dobra razlikovalna moč -standardizacija, ponovljivost -visoka cena -zaznava genov za virulenco in odpornost	(86, 110)

Legenda: PFGE = gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (*angl.*: Pulsed-field gel electrophoresis); REP-PCR = in vitro pomnoževanje repetitivnih zaporedij (*angl.*: Repetitive element palindromic PCR); MLVA = analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (*angl.*: Multiple-locus variable number tandem repeat analysis); MLST = tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (*angl.*: multilocus sequence typing); WGS = določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma (*angl.*: whole genome sequencing); ST = sekvenčni tip (*angl.*: sequence type); CC klonalni kompleks (*angl.*: clonal complex).

Izbor metode je, podobno kot pri tipizacijah drugih bakterij, odvisen od vrste problema, ki ga z metodo želimo razrešiti. Ob izbruhih okužb z virulentnimi ali večkratno odpornimi sevi *P. aeruginosa* je priporočljivo izbrati metodo z dobro razločevalno močjo, kjer do rezultatov pridemo v kratkem času, kot je npr. MLVA (*angl.*: Multiple-locus variable number tandem

repeat analysis). Kadar se hkrati pojavlja izbruh na več različnih lokacijah je primerno izbrati bolj robustno metodo, ki ima poleg tega tudi dobro primerljivost, npr. PFGE.

Novejše metode, kot so MLVA, MLST in mikromreže imajo podobno razločevalno moč kot standardna PFGE, rezultate pa dosežemo hitreje. Njihova slaba stran je predvsem draga oprema in zahtevnost izvedbe oz. tolmačenja.

Vse bolj se uporabljajo metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja, saj te omogočajo edinstvene, ponovljive, primerljive in prenosljive podatke osnovane na univerzalni genetski kodi, in so lahko dosegljivi na podatkovnih bazah svetovnega spleta. Sekvenciranje celotnega genoma nam nudi podatke, ki nam omogočajo identifikacijo, razširjeno tipizacijo mikroorganizma ter opredelitev nukleotidnih zaporedij povezanih z odpornostjo proti protimikrobnim zdravilom in z virulenčnimi dejavniki (76).

2.7. Genom bakterije *P. aeruginosa*

Genom *P. aeruginosa*, ki bakteriji omogoča odlično sposobnost prilagajanja različnim pogojem in gostiteljem, je eden od večjih med do sedaj sekvenciranimi genomi prokariotov. Velikost genoma, ki nosi zapis za okoli 6000 genov, znaša od 5,5 do 7 Mbp, vsebnost GC je relativno visoka – 66 %. (111, 112). Za vsestransko sposobnost preživetja so zlasti pomembni različni geni, ki nosijo zapise za beljakovine zunanje membrane, transportne sisteme, encime vključene v metabolizem in prevzem hranil, ter številni regulatorni geni (113).

Prvi popolnoma sekvencirani genom *P. aeruginosa* je bil genom seva *P. aeruginosa* PA01 (114). Obsega 6,3 Mbp, in nosi zapis za približno 5570 odprtih bralnih okvirjev – ORF (*angl.*: Open reading frame – ORF). Genski zapis kodira številne gene vključene v regulacijo, katabolizem in transport organskih snovi (111, 114). Predvideva se, da je približno 10% genov pri PA01 vključenih v regulatorne funkcije (115). Prvemu popolnoma sekvenciranemu genomu bakterije *P. aeruginosa* leta 2000 so hitro sledili drugi. Popolne in delne sekvence se objavljajo na podatkovni bazi NCBI GenBank (116). Danes najdemo tu podatke za več kot 2650 sekvenciranih genomov *P. aeruginosa* (oktober 2017), od tega za večino obstaja delna (*draft*) sekvenca, za 98 genomov pa je na voljo kompletna sekvenca (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/187>).

Na osnovi znanih sekvenc večjega števila izolatov so ugotovili, da podobno kot pri drugih bakterijah, lahko razdelimo celotni genom vrste – pangenom (*angl.*: pangenome) na dele, ki so relativno nespremenljivi in dobro ohranjeni pri večini sevov – osrednji genom (*angl.*: core genome) in dele, ki se med izolati razlikujejo – pomožni genom (*angl.*: accessory genome).

DNK osrednjega genoma je v splošnem med sevi kolinearno urejena (117), njeno zaporedje je visoko ohranjeno, med sevi se razlikuje le za 0,5–0,7% (111, 118, 119). V osrednjem genomu najdemo večino genov povezanih z vzdrževalnimi (»housekeeping«) funkcijami (120).

Kromosom *P. aeruginosa* je mozaična struktura nastala tako, da osrednji genom pogosto prekinjajo vgrajeni bloki akcesornega genoma (117). H genomski raznolikosti *P. aeruginosa* največ prispevajo elementi akcesornega genoma pridobljeni s horizontalnim genskim prenosom (HGT, *angl.*: horizontal gene transfer), ki lahko obstajajo kot izvenkromosomalni elementi (npr.: plazmidi), ali pa bloki DNK na različnih lokusih vgrajeni v kromosom *P. aeruginosa* (117). Mozaični genom *P. aeruginosa* je zelo spremenljiv, k temu poleg HGT prispevajo delecije, inverzije in mutacije na nivoju posamičnih nukleotidov (117).

2.7.1 Akcesorni genom *P. aeruginosa*

Akcesorni genom *P. aeruginosa* sestavljajo elementi DNK velikosti od nekaj sto bp do več kot 100 kbp. Minimalna velikost obsega vsaj štiri kontinuirane odprte bralne okvirje – ORF (120).

Elementi akcesornega genoma so genomski otočki (*angl.*: genomic islets) (<10 kb) ali genomski otoki (*angl.*: genomic islands) (>10 kb), ki so se prenesli kot mobilni genetski elementi in so se integrirali v genom gostitelja kot (pro)fagi, fagom podobni elementi, transpozoni, insercijske sekvence, integrativni in konjugativni elementi, nadomesti otoki (*angl.*: »replacement« islands) in integroni (113, 121, 122). Nekateri avtorji jih navajajo pod skupnim imenom akcesorni genomski elementi – AGE (*angl.*: accessory genomic elements – AGE) (113). V genomu gostitelja akcesorni genom ne predstavlja kontinuirane strukture, posamični elementi so vgrajeni v kromosom gostitelja na t.i. področjih genomske plastičnosti – RGP (*angl.*: region of genomic plasticity – RGP) (120). Izvor akcesornih genov, ki lahko prispevajo k metabolni raznovrstnosti in patogenezi, so lahko različni prokarionti (123). Akcesorni genom je pomemben za preživetje posamičnih sevov v določenem okolju (113). Tako npr. pri sevih, ki so jih osamili iz vzorcev, ki vsebujejo težke kovine, najdemo gene, ki posredujejo odpornost proti le-tem (124). Pri sevih, ki so jih osamili iz kužnin, se številni geni povezani z virulenco nahajajo v elementih akcesornega genoma (16, 125, 126, 127). Genski zapisi povezani z prirojenimi mehanizmi odpornosti so v sestavi osrednjega genoma, medtem ko so geni, ki nosijo zapise za pridobljene mehanizme odpornosti, del akcesornega genoma (28, 113). Ker se ti geni lahko prenašajo med sevi je pomembna njihova vloga pri nastanku okužb povezanih z zdravljenjem (113).

Akcesorni genom se od osrednjega genoma loči tudi po GC sestavi in po zastopanosti različnih kodonov za posamezno aminokislino (angl., oligonucleotide usage) (128).

Napredek v načinu sekvenciranja, ki ga je prineslo NGS, nam omogoča hitrejše, cenejše in natančnejše pridobivanje podatkov o celotnih genomih posamičnih sevov. Veliko število popolnih genomov nam omogoča boljšo opredelitev osrednjega genoma in določitev akcesornega genoma pri na novo sekvenciranih sevih (113).

2.8 Študije primerjalne genomike pri bakteriji *P. aeruginosa*

Genomika je veda, ki s pomočjo določanja in analiziranja nukleotidnega zaporedja proučuje celotne genome organizmov. Z razvojem NGS določanja nukleotidnega zaporedja, ki omogoča hitro in natančno pridobivanje zaporedja dolgih odsekov DNKa oz. celotnega genoma, je genomika dobila orodje, ki v primerjavi s klasično Sangerjevo metodo sekvenciranja omogoča hitrejše in cenovno bolj ugodno delo ob manjši možnosti napak zaradi kontaminacije. So pa v primerjavi s klasičnim sekvenciranjem višji zagonski stroški. Za analizo in obdelavo dobljenih podatkov potrebujemo napredna programska orodja in računalnike z veliko procesorsko močjo.

Genomske študije uporabljamo za:

- a) proučevanje evlucijskih sprememb in fenotipično profiliranje pri bakterijah, ko se le-te prilagajajo določeni ekološki niši. Na tem področju je bilo veliko raziskav kjer ugotavljajo spremembe, ki jih opazujemo pri *P. aeruginosa* ob okužbah v sklopu cistične fibroze (CF) (112, 129, 130, 131, 132),
- b) molekularno epidemiologijo, kjer s pomočjo genotipizacije sledimo poti širjenja in določimo izvor posamičnega izbruha (37, 133, 134, 135),
- c) proučevanje in iskanje mehanizmov odpornosti (12, 136, 137, 138, 139),
- d) proučevanje dejavnikov virulence (111, 140, 141, 142).

2.9. Vloga okoljskih rezervoarjev pri širjenju odpornosti proti antibiotikom pri *P. aeruginosa*

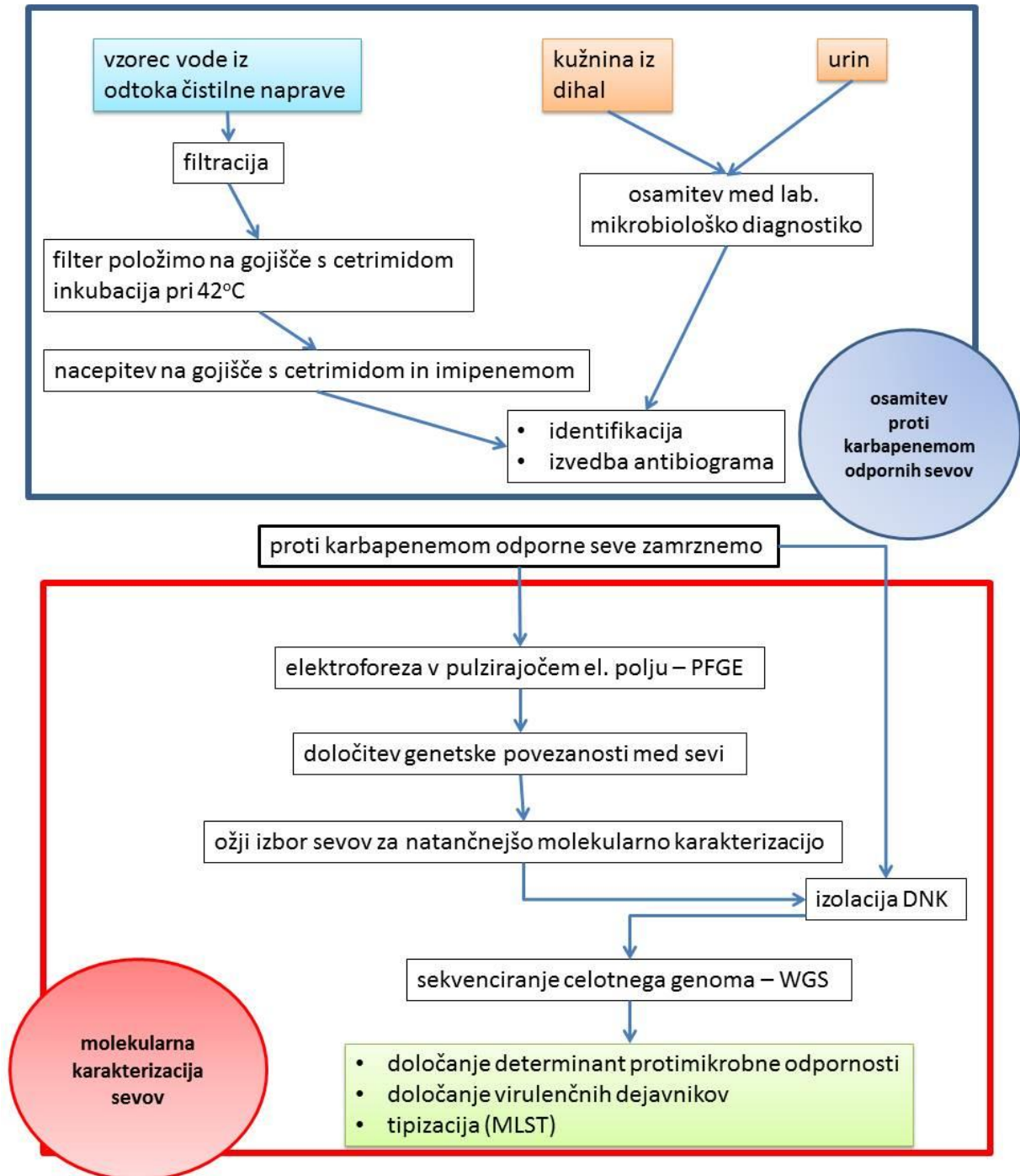
Za razumevanje epidemiologije odpornih sevov je pomembno tudi poznavanje širjenja bakterijske odpornosti v izvenbolnišničnem okolju. Odpadne vode iz bolnišnic, gospodinjstev, industrije in agronomije, ki se zbirajo in prečiščujejo v čistilnih napravah, pogosto vsebujejo večkratno odporne bakterije in tudi subinhibitorne koncentracije antibiotikov, razkužil in težkih

kovin (12, 143, 144, 145). Takšno okolje v čistilnih napravah vpliva na selekcijo odpornih sevov, vzpodbuja nastajanje odpornih sevov »de novo« in omogoča HGT (146, 147, 148).

Večkratno odporne seve *P. aeruginosa* so opisali v povezavi z različnimi vodnimi viri, kot so: odpadne vode, vode čistilnih naprav, reke, kopališča in termalne vode (12, 149, 150 151). Ta mesta tako predstavljajo trajen vir za kontaminacijo okolja in kolonizacijo ter razvoj okužbe pri posameznikih z dejavniki tveganja (23, 152). So tudi potencialni viri za širjenje rezistenčnih genov, ki se nahajajo na mobilnih genetskih elementih (147, 148).

3. METODE DE LA

Potek raziskave in postopke, ki smo jih uporabili pri molekularni karakterizaciji proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* iz kužnin in okolja prikazuje slika 3.1.



Slika 3.1: Potek raziskave in postopki, ki smo jih uporabili pri molekularni karakterizaciji proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* iz kužnin in okolja.

3. 1 Izbor sevov *P. aeruginosa* iz kužnin

Proti karbapenemom odporne seve *P. aeruginosa* smo iskali v kužninah dihal in vzorcih urina, ki so jih na mikrobiološke preiskave Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Centra za Medicinsko mikrobiologijo, Nacionalnega laboratorija za okolje, zdravje in hrano (OMM, CMM, NLZOH), poslali iz dveh območnih bolnišnic in večjega števila ambulant v obdobju od 1. januarja do 31. decembra 2014. Skupaj je bilo v raziskavo zajetih 8 zdravstvenih ustanov: večja učna bolnišnica (približno 1.300 postelj, okoli 55.000 letnih odpustov), manjša regionalna bolnišnica (260 postelj, 13.000 letnih odpustov) in 6 splošnih ali specializiranih ambulant. Kužnine smo obdelali po standardnih navodilih za delo na OMM. Seve iz dihal smo nacepili na gojišča: krvni agar (Biolife Italiana, Milano, Italija), čokoladni agar, ki ima za osnovo GC agar z dodatkom hemoglobina in Vitox suplementa (vse Oxoid Limited, Hampshire, VB), in selektivno gojišče Endo agar (Himedia, Himedia laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). Gojišča smo inkubirali pri 36 °C za obdobje 24 do 48 ur. Urine smo nacepili na gojišče CLED (*angl.*: cysteine electrolite deficient agar – CLED) (Oxoid Limited, Hampshire), ki smo ga prav tako inkubirali od 24 do 48 ur.

Osamljene bakterije smo identificirali do nivoja vrste s pomočjo masne spektrometrije z metodo ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov - MALDI-TOF (*angl.*: matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight - MALDI-TOF), z uporabo komercialne knjižnice masnih spektrov (Microflex MALDI-TOF, Bruker, Daltonics, Bremen, Nemčija).

Pri vseh osamljenih sevih *P. aeruginosa* smo testirali občutljivost na protimikrobna zdravila z uporabo disk difuzijske metode, kot jo predpisujejo navodila EUCAST (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/). Testirali smo občutljivost na ceftazidim (CAZ, 30 µg), cefepim (FEP, 30 µg), piperacilin s tazobaktamom (TZP, 100/10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), ciprofloksacin (CIP, 5 µg), tobramicin (NN, 10 µg), gentamicin (GM, 10 µg), amikacin (10 µg) in netilmicin (NET, 10 µg).

Za testiranje občutljivosti smo uporabili 18-24 urno bakterijsko kulturo *P. aeruginosa*. S sterilnim brisom smo pobrali bakterijske kolonije z agarske plošče in jih suspendirali v 0,85 % raztopini NaCl, končna dosežena gostota v homogeni suspenziji je bila 0,5 McFarlanda. Z brisom smo nato s pomočjo inokulatorja prenesli suspenzijo na Mueller-Hinton agar (Biolife Italiana, Milano, Italija). Pred polaganjem antibiotičnih diskov (Becton Dickinson, Maryland, ZDA) smo počakali do 15 minut. Diske smo položili z avtomatskim polagalcem. Inokulirane

plošče s položenimi diski smo inkubirani v termostatu pri sobni atmosferi in pri 35°C za 18-24 ur. Po inkubaciji smo s pomočjo kljunastega merila izmerili premere zaviralnih con okoli posamičnih antibiotičnih diskov. Testirane bakterije smo na podlagi predpisanih kriterijev (interpretativne tabele) uvrstili kot občutljive (S), intermediarne (I) ali odporne (R).

Nadzor kakovosti testiranja za protimikrobna zdravila smo izvajali z uporabo referenčnih sevov *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in *E. coli* (ATCC 25922).

Seve *P. aeruginosa*, ki so bili glede na rezultate disk difuzijske metode odporni proti ali vmesno občutljivi za imipenem in/ali meropenem, smo precepili in zamrznili pri – 70 °C. Zamrznili smo po en sev vsakega bolnika, razen v primeru ko se rezultati testiranja (antibiogrami) na protimikrobna zdravila med sevi razlikujejo – različni rezistotipi. V tem primeru smo zamrznili po en rezistotip na bolnika.

3. 2 Osamitev in izbor sevov *P. aeruginosa* iz vzorcev čistilnih naprav

Ob iztoku iz čistilne naprave smo v enoletnem obdobju od 1. januarja do 31. decembra 2014 enkrat mesečno odvzeli po 500 ml 24-urnega reprezentativnega vzorca. Vzorčili smo vodo dveh mehanično-bioloških čistilnih naprav. Večja od njiju ima letni pretok $11.000 \times 10^6 \text{ m}^3$, v njej se zbira tudi odpadna voda iz večje – učne bolnišnice, ki smo jo vključili v raziskavo. Manjša biološko-mehanična čistilna naprava ima letni pretok $5.212 \times 10^6 \text{ m}^3$; vanjo se steka odpadna voda iz manjše, regionalne bolnišnice, ki je vključena v raziskavo.

Za osamitev psevdomonasov smo uporabili selektivno gojišče cetrimidni agar (Merck, Darmstadt, Nemčija), ki se standardno uporablja v živilski mikrobiologiji. Proti karbapenemom odporne seve smo selekcionirali tako, da smo temu agarju dodali imipenem. Selektivno gojišče smo pripravljali v laboratoriju tako, da smo v gojišče s cetrimidom dodali antibiotik imipenem v koncentraciji 4 μg na ml gojišča. Glede na EUCAST-ove smernice iz leta 2014 je to zgornja koncentracija imipenema, ki definira občutljive seve (<http://www.eucast.org/>). Na pripravljenem gojišču so torej porastli vsi sevi, ki so sposobni rasti pri 4 ali več μg imipenema na ml. Občutljivost teh sevov smo nato testirali z izvedbo disk difuzijskega antibiograma po EUCAST-ovih smernicah.

Vodo smo mikrobiološko obdelali znotraj 6 ur, do obdelave smo jo shranili v hladilniku pri 4 °C. Čez bakteriološki filter, ki ima pore premera 0,45 μm , smo prefiltrirali po 50 in 100 ml vode iz čistilne naprave ter filter inkubirali 48 ur na selektivnem gojišču s cetrimidom in dodanim imipenemom pri 42 °C.

Seve *P. aeruginosa*, ki so bili glede na rezultate disk difuzijske metode odporni proti ali vmesno občutljivi za imipenem, smo precepili in zamrznili pri – 70°C.

Odpornost proti okoljskim izolatom smo določali enako kot odpornost pri kliničnim izolatom, kot je opisano v poglavju 3.1. Tudi pri okoljskih sevih smo občutljivost na ceftazidim (CAZ, 30 μg), cefepim (FEP, 30 μg), piperacilin s tazobaktamom (TZP, 100/10 μg), imipenem (IPM, 10 μg), meropenem (MEM, 10 μg), ciprofloksacin (CIP, 5 μg), tobramicin (NN, 10 μg), gentamicin (GM, 10 μg), amikacin (10 μg) in netilmicin (NET, 10 μg) testirali z disk difuzijsko metodo po EUCAST-ovih smernicah (<http://www.eucast.org>)

3.3 Gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju

Povezavo med izolati smo potrjevali retrogradno, vse zamrznjene izolate smo odmrznili in jim s pulzno gelsko elektroforezo (PFGE) določili pulzotipe. Za osamitev intaktne genomske DNK

smo uporabili protokol za po Gramu pozitivne bakterije (153) z nekaterimi modifikacijami (154).

Za restrikcijo genomske DNK smo uporabili encim SpeI (New England Biolabs). Makrorestriksijske fragmente smo ločili v 1,2-odstotnem agaroznem gelu (Pulsed field Certified™ Agarose, Bio-Rad), ki smo ga pripravili s pufrom 0,5 x TBE in uporabo sistema PFGE (Biometra – Pulsed Field Gel Electrophoresis system). Za standardno DNK-lestvico smo uporabili genomsko DNK seva Salmonella ser. Braenderup (H9812) razrezano z encimom *Xba*I.

Makrorestriksijske profile smo analizirali s programom BioNumerics verzija 7.5 (Applied Maths) in jo normalizirali s pomočjo standardnega seva. Sorodnosti med sevi smo izračunali s koeficientom Dice in z neutežno metodo parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA) konstruirali drevo podobnosti. Pri določanju položajev fragmentov smo dopustili 1,1 % toleranco in določili optimizacijo 1,1 %.

Po merilih, ki so jih predlagali van Belkum in sod. (83) in Tenover in sod. (82), smo kot sorodne (spadajo v isti pulzotip) označili izolate, katerih vzorci restriksijskih fragmentov so se razlikovali v največ 3 fragmentih, kot verjetno sorodne pa izolate z največ 6 fragmenti razlike (koeficient Dice 0,8) (155).

3.4 Sekvenciranje celotnega genoma

Iz vsakega PFGE tipa smo izbrali enega ali več predstavnikov, ki smo jim določili celotno nukleotidno zaporedje, pri čemer smo za izbor uporabili naslednje kriterije:

- en predstavnik vsakega pulzotipa
- če se je isti pulzotip pojavljal na večih lokacijah – en predstavnik na pulzotip na lokacijo
- pulzotipi z večjim številom izolatov – 3 predstavniki na pulzotip na lokacijo

Sekvenciranje genomov je bilo narejeno na Oddelku za mikrobiološke raziskave, CMM, NLZOH. Genomsko DNK so osamili z uporabo kompleta QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hiden, Nemčija) upošteva je protokol za osamitev DNK iz po Gramu negativnih bakterij. DNK knjižnice so v skladu z navodili proizvajalca pripravili s kompletom Nextera XT sample preparation Kit (Illumina, San Diego, ZDA). Nukleotidno zaporedje so določali z uporabo kompleta MiSeq Reagent Kit (Illumina, San Diego, ZDA) po navodilih

proizvajalca na aparatu Miseq (Illumina, San Diego, ZDA). Genska zaporedja so sestavili s pomočjo programskega paketa SeqSphere+ software (Ridom GmbH, Münster, Nemčija).

3.5 MLST tipizacija

MLST tipizacija je bila narejena na Oddelku za mikrobiološke raziskave, CMM, NLZOH. Na osnovi nukleotidnih zaporedij celotnega genoma so, s pomočjo programskega paketa SeqSphere+ software (Ridom GmbH, Münster, Nemčija), izvedli MLST tipizacijo, ki temelji na 7 izbranih vzdrževalnih genih. Določili so znane sekvenčne tipe (ST), še neznan - nove profile MLST pa so posredovali na spletno podatkovno bazo PubMLST (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>), kjer so jim bili dodeljeni sekvenčni tipi. S pomočjo programskega paketa BioNumerics software v7.6 (Applied Maths) so na osnovi profilov MLST ustvarili minimalno vpeto drevo (minimum spanning tree).

3.6. Analiza genomskih sekvenc – rezistenca in dejavniki virulence

S pomočjo spletnih orodij smo iskali gene povezane s pridobljeno rezistenco in gene povezane z dejavniki virulence. Spletna orodja delujejo tako, da znane sekvence povezane z odpornostjo in virulenčnimi dejavniki s pomočjo računalniških algoritmov iščejo znotraj celotnih genomskih sekvencah.

Gene, ki so povezani s pridobljeno odpornostjo, smo pri izbranih sevih določali s pomočjo dveh spletnih aplikacij: Resfinder 2.1 web-service (156) in Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca>) (157, 158, 159).

Genske zapise za dejavnike virulence smo potrjevali s pomočjo My DataBase Finder 1.1 (www.genomicpidemiology.org), kjer smo uporabili znane sekvence virulenčnih dejavnikov *P. aeruginosa*, ki so dosegljive na spletni strani »VFDB: Virulence Factors Database« (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Pseudomonas>).

4. REZULTATI

4.1 Proti karbapenemom odporni sevi *P. aeruginosa* iz bolnišnic in čistilnih naprav

Skupno smo osamili 213 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*. Od tega smo 130 proti karbapenemom odpornih sevov osamili iz kužnin, 83 pa iz vzorcev vode biološko-mehaničnih čistilnih naprav.

Proti karbapenemom odporne seve iz kliničnih kužnin smo iskali v kužninah urina in spodnjih dihal, ki so nam jih poslali na mikrobiološke preiskave iz osmih zdravstvenih organizacij. Proti karbapenemom odporne seve smo osamili pri kužninah iz 4 od 8 zdravstvenih institucij. Večino, 125 proti karbapenemom odpornih sevov, smo osamili iz kužnin, ki so bile poslane iz večje učne bolnišnice. Iz manjših zdravstvenih institucij smo osamili le 5 proti karbapenemom odpornih sevov.

Iz iztoka čistilnih naprav smo od skupno 83 proti karbapenemom odpornih sevov iz večje čistilne naprave osamili 61 sevov in iz manjše čistilne naprave 22 sevov.

Proti karbapenemu odporne seve *P. aeruginosa* smo osamili pri 109 bolnikih iz kužnin dihal in/ali urina. Vsega skupaj smo v obdobju od 1.1.2014 do 31.12.2014 osamili *P. aeruginosa* iz kužnin dihal in/ali urina pri 558 bolnikih. Delež proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* pri bolnikih je znašal 19,5 %.

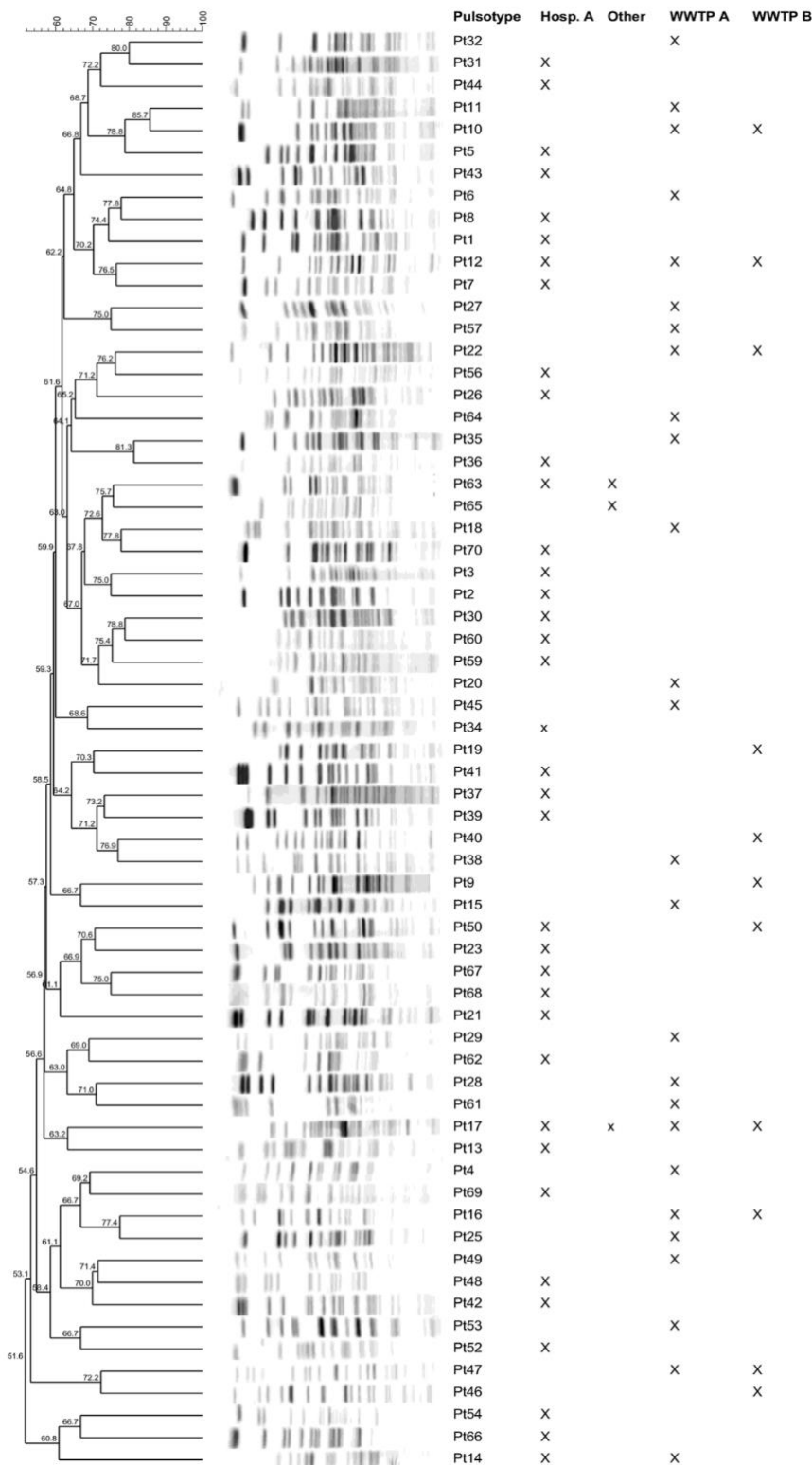
4.2 Določitev pulzotipov proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* z elektroforezo v pulzirajočem električnem polju

Skupno 213 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* iz kliničnih in okoljskih sevov smo z elektroforezo v pulzirajočem električnem polju razvrstili v 65 pulzotipov (slika 4.1 in tabela v prilogi I.).

Pri 109 bolnikih smo osamili 130 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*, od teh smo jih s PFGE 127 uvrstili v 38 pulzotipov. Pri treh sevih tipizacija ni uspela, možen razlog za neuspelo tipizacijo bi lahko bila visoka vsebnost endogenih nukleaz (nekateri navajajo visoko znotrajcelično koncentracijo endonukleaz (160)). Večina sevov, ki smo jih osamili pri bolnikih, je pripadala bolnikom iz večje učne bolnišnice. Teh 125 sevov smo razvrstili v 37 različnih pulzotipov. Med njimi je prevladoval pulzotip Pt1, ki smo ga osamili v 57 primerih (45,6% izolatov). Drugi pulzotipi so zajemali od enega do osem izolatov (Tabela – priloga I).

Iz manjših zdravstvenih institucij smo osamili 5 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*, ki so pripadali 3 različnim pulzotipom.

Iz čistilnih naprav smo osamili 83 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*. Enainosemdeset sevov smo lahko tipizirali in jih razvrstili v 31 pulzotipov. Iz večje čistilne naprave smo osamili 61 sevov, od tega smo jih s PFGE tipizirali 59 in jih razvrstili v 26 pulzotipov. Iz manjše čistilne naprave smo osamili 22 sevov, ki so se razporedili v 11 pulzotipov. Podobno kot pri kliničnih, tudi med okoljskimi izolati ugotavljamo prevlado posamičnega pulzotipa – Pt10, v katerega se je uvrstilo 18 izolatov (21,7 %). Med preostale pulzotipe se je razporedilo od ena do devet izolatov.



Slika 4.1: Pulzotipi sevov *P. aeruginosa* in njihov izvor

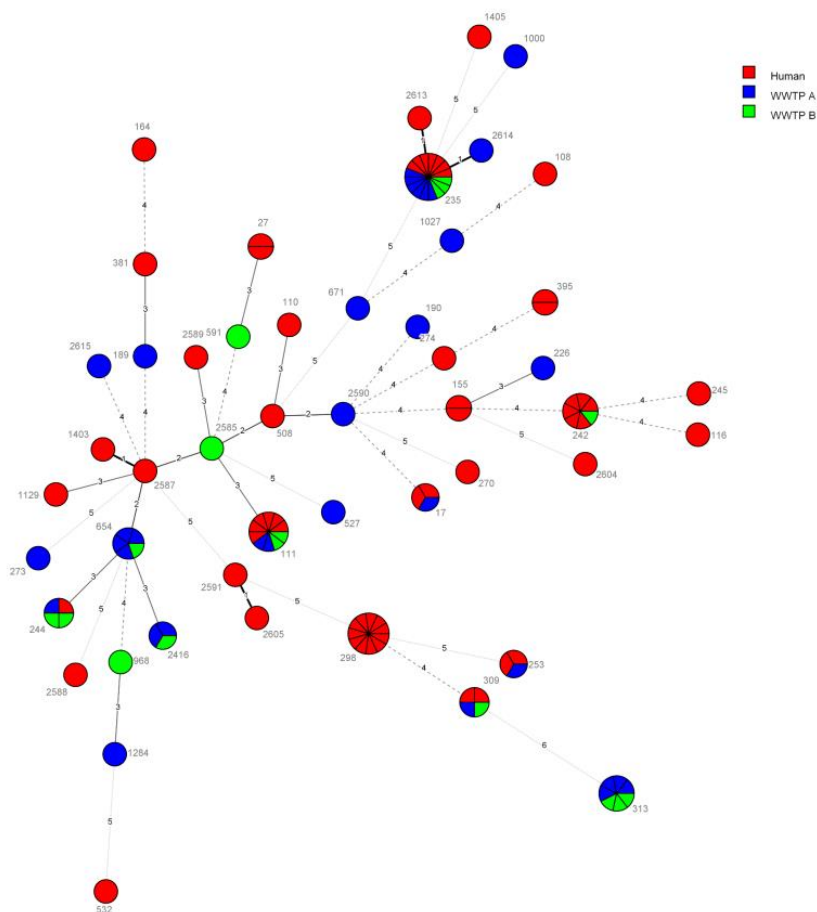
Povzeto po članku (161): Golle A, Janežič S, Rupnik M. Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. PLoS One 2017;12(10):e0186736. Legenda: Pulsotype = pulzotip, Hosp. A = večja učna bolnišnica, Other = druge lokacije, WWTP A = večja čistilna naprava, WWTP B = manjša čistilna naprava.

4.3 Razporeditev tipov MLST med kliničnimi in okoljskimi sevi *P. aeruginosa*

MLST tipizacijo smo izvedli na osnovi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma. Sekvenčni profil in na osnovi tega sekvenčni tip (ST) smo določili 112 sevom (61 sevov iz kužnin, 51 sevov iz okolja) (Tabela 4.1 in Priloga I).

Pri 98 sevih smo ugotovili že znane ST, pri 14 sevih pa smo določili 12 sekvenčnih profilov, ki še niso imeli dodeljenega ST. Neznane sekvenčne profile smo posredovali na podatkovno bazo PubMLST database (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>), kjer so jim dodelili sekvenčni tip. Novi sekvenčni tipi so bili: 2416, 2585, 2587–2591, 2604, 2605, 2613–2615.

Na osnovi profilov MLST smo ustvarili minimalno vpeto drevo (minimum spanning tree) (Slika 4.2).



Slika 4.2: Minimalno vpeto drevo – MLST profili izbranih sevov proti karbapenemom odpornih *P. aeruginosa* iz bolnišnic in čistilnih naprav.

Povzeto po članku (161): Golle A, Janežič S, Rupnik M. Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. PLoS One 2017;12(10):e0186736. Legenda: Human = sevi iz kliničnih kužnin; WWTP A = sevi iz večje čistilne naprave, WWTP B = sevi iz manjše čistilne naprave; vsak krog predstavlja en sekvenčni tip (ST=številka), razdeljen je v sektorje, ki predstavljajo število izolatov znotraj tega ST. Številka izpisana ob črti, ki povezuje dva kroga predstavlja število različnih lokusov med sekvenčnimi tipi.

Med ST in pulzotipi smo v splošnem ugotavljali ujemanje, ki pa ni bilo absolutno. Med nekatere ST se je uvrstilo več pulzotipov (do 7) (Tabela 4.1), prav tako so se znotraj posamičnih pulzotipov v nekaterih primerih uvrstili različni ST (Priloga I).

Večino sekvenčnih tipov smo osamili samo iz vzorcev iz posamičnega vira, sedem sekvenčnih tipov pa smo osamili iz dveh ali več virov (Tabela 4.2).

Stopetindvajset karbapenem odpornih sevov smo našli pri 109 bolnikih.

Pri 7 bolnikih smo osamili več zaporednih izolatov, ki so se medsebojno razlikovali glede občutljivosti za protimikrobna zdravila (Tabela 4.3). Pri vseh bolnikih, razen pri enem, so bili sevi istega pulzotipa in tudi MLST tipa, izjema je bil bolnik (številka 4.), kjer sta seva imela enak MLST, vendar različen pulzotip.

Tabela 4.1.: Ujemanje sekvenčnih tipov in pulzotipov

ST	Pulzotip (Pt)	Število sekvenciranih sevov				
		Učna bolnišnica	Druge zdravstvene ustanove	Čistilna naprava A	Čistilna naprava B	Skupno
17	2, 25	2		1		3
27	54	2				2
108	21	1				1
110	48	1				1
111*	17, 31, 65	3	3	2	2	10
116	34	1				1
155	7, 43	2				2
164	69	1				1
189	6			1		1
190	4			1		1
226	53			1		1
235	3, 5, 10, 11, 27, 32, 70	6		6	2	15
242	50, 52, 68	6			1	7
244	19, 20, 60	1		1	2	4
245	13	1				1
253	14, 66	2		1		3
270	30	1				1
273	45			1		1
274	63		1			1
298	1, 54, 56, 67	12				12
309	12	4				4
313	10, 15, 16, 47			4	3	7
381	26	1				1
395	73	1				1
508	63	1				1
527	38			1		1

ST	Pulzotip (Pt)	Število sekvenciranih sevov				
		Učna bolnišnica	Druge zdravstvene ustanove	Čistilna naprava A	Čistilna naprava B	Skupno
532	36	1				1
591	46				1	1
654	18, 47			4	1	5
671	29			1		1
968	9				1	1
1000	61			1		1
1027	35			1		1
1129	70	1				1
1284	64			1		1
1403	42	1				1
1405	59	1				1
2416	22			2	1	3
2585	40				1	1
2587	41	1				1
2588	23	1				1
2589	39	1				1
2590	28			1		1
2591	44	1				1
2604	62	1				1
2605	8	1				1
2613	NT	1				1
2614	57	1				1
2615	49	1				1
Skupaj		62	4	31	15	112

Legenda: odebeljena pisava – pojavi se na vsaj dveh lokacijah, podčrtano – pojavi se na 3 ali več lokacijah; ; NT – izolata ni bilo možno tipizirati; * - ST, ki je bil prisoten na vseh lokacijah

Tabela 4.2. Pojavljanje sekvenčnih tipov glede na izvor vzorca

	Učna bolnišnica	Druge zdravstvene ustanove	Čistilna naprava A	Čistilna naprava B
ST	<u>111, 235, 244</u> 17, 253 27,108,110, 116,155, 242, 245, 270, 274, 298, 309, 381, 395, 508, 532, 1129, 1403, 1405, 2587, 2588, 2589, 2591, 2604, 2605, 2613	<u>111</u>	<u>111, 235, 244</u> 17, 313, 654, 253, 189, 190, 226, 273, 309, 527, 671, 1000, 1027, 1284, 2416, 2590, 2614, 2615	<u>111, 235, 244</u> 313, 654 242, 309, 968, 2416, 2585
skupaj število ST	31	1	21	10

Legenda: odebeljena pisava – pojavi se na vsaj dveh lokacijah, podčrtano – pojavi se na 3 ali več lokacijah

Tabela 4.3.: Zaporedni izolati pri posamičnih bolnikih, ki so se medsebojno razlikovali glede občutljivosti:

Bolnik št.	PFGE (pulzotip)	Datum osamitve		Občutljivost na protimikrobno zdravilo									
			MLST	TZP	FEP	IPM	MEM	CAZ	CIP	AN	GM	NET	NN
1	Pt1	11.11.	298	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
1	Pt1	25.11.	298	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
2	Pt1	2.12.	298	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
2	Pt1	13.12.	298	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
3	Pt50	3.5.	242	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
3	Pt50	28.4.	242	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
4	Pt50	2.6.	242	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
4	Pt68	4.11.	242	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
5	Pt5	24.11.	235	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
5	Pt5	22.11.	235	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	Pt31	25.11	111	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
6	Pt31	17.11	111	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7	Pt2	26.4.	17	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
7	Pt2	3.11.	17	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S

Legenda: PFGE = gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (*angl.*: Pulsed-field gel electrophoresis); MLST = tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (*angl.*: multilocus sequence typing); TZP = piperacilin s tazobaktamom; FEP = cefepim; IPM = imipenem; MEM = meropenem; CAZ = ceftazidim; CIP = ciprofloksacin; AN = amikacin; GM = gentamicin; NET = netilmicin; NN = tobramicin;

4.4 Odpornost proti drugim protimikrobnim zdravilom pri protti karbapenemom odpornih sevih *P. aeruginosa* iz bolnišnic in čistilnih naprav

Testirali smo občutljivost 130 sevov pridobljenih iz kužnin 109 bolnikov in 83 izolatov iz čistilnih naprav. Pri analizi nismo upoštevali ponovnih izolatov pri istih bolnikih, razen kadar se je občutljivost zaporednih izolatov razlikovala (glej Materiali in metode). Pri sevih, ki smo jih osamili iz vode čistilnih naprav smo v analizo vključili za vsak pulzotip le po en reprezentativni sev glede na vzorec odpornosti mesečno. S tem se je število sevov iz čistilnih naprav, ki smo jih vključili v končno primerjalno analizo, zmanjšalo iz 83 na 62.

Rezultate testiranja občutljivosti podajata tabeli 4.4 in 4.5. Če primerjamo humane in okoljske seve glede na odpornost proti posamičnim antibiotikom, ugotavljamo visok delež odpornosti proti kombinaciji piperacilina s tazobaktamom (52,3 %) in proti ceftazidimu (42,3 %) pri sevih, ki smo jih osamili iz kliničnih kužnin, medtem ko pri sevih, ki smo jih osamili iz vod čistilnih naprav ugotavljamo visok delež odpornosti proti ceftazidimu (37,1 %), ciprofloksacinu (35,5) in aminoglikozidom (Tabela 4.4).

Glede na različne vzorce odpornosti smo seve razdelili v 10 skupin (tabela 4.5). Večina sevov (47/130 med kliničnimi in 33/61 med okoljskimi sevi) je bila odporna izključno proti karbapenemom (imipenemu in/ali meropenemu). Druga največja skupina je vključevala seve, ki so bili odporni proti 4 različnim skupinam antibiotikov (skupina X). Klinični sevi so kazali večjo pestrost vzorcev odpornosti, saj so bili prisotni v vseh 10 skupinah odpornosti, medtem ko okoljske izolate najdemo le v petih (tabela 4.5).

Tabela 4.4. Deleži odpornosti proti posamičnim antibiotikom

Antibiotik	% rezistentnih sevov (število sevov)	
	Sevi iz kliničnih vzorcev (N=130 ^a)	Sevi iz okolja (N=62 ^b)
piperacilin/tazobaktam	52.3 (68)	30.6 (19)
cefepim	26.2 (34)	27.4 (17)
ceftazidim	42.3 (55)	37.1 (23)
ciprofloksacin	27.7 (36)	35.5 (22)
amikacin	13.1 (17)	16.1 (10)
gentamicin	10.0 (13)	27.4 (17)
netilmicin	20.8 (27)	32.2 (20)
tobramicin	9.2 (12)	30.1 (19)

a – posamičen izolat na bolnika, b – vsi izolati iz istega vzorca z identičnim PFGE profilom so bili upoštevani kot identičen sev

Tabela 4.5. Razdelitev sevov proti karbenemom odpornih *P. aeruginosa* in njihovih pulzotipov glede na vzorce odpornosti.

Skupina	Vzorec odpornosti (odporni proti)	Bolniki			Čistilne naprave		
		Izolati N (%)	Odgovarjajoči pulzotipi (130 sevov ^a)	Odgovarjajoči ST (61 sevov ^b)	Izolati N (%)	Odgovarjajoči pulzotipi (62 sevov ^c)	Odgovarjajoči ST (51 sevov ^b)
A	karbapenemi	46 (35.4)	Pt1, Pt7, Pt12, Pt14 , Pt30, Pt36, Pt37, Pt41, Pt48, Pt50, Pt54, Pt56, Pt60, Pt63, Pt66, Pt67, Pt69, Pt70	298, 155, 309, 253, 508, 2587, 110, 27, 244, 508, 253, 164, 1129 (61 sevov)	33 (53.2)	Pt2, Pt4, Pt6, Pt9, Pt14 , Pt15, Pt16, Pt18, Pt19, Pt20, Pt22, Pt25, Pt27, Pt28, Pt32, Pt35, Pt38, Pt40, Pt46, Pt49, Pt53, Pt57, Pt61, Pt64	253, 190, 189, 968, 313, 654, 244, 2416, 17, 235, 2590, 1027, 527, 2585, 591, 2615, 226, 2614, 1000
B	karbapenemi nekateri od testiranih betalaktamov (CAZ, TZP, FEP)	28 (21.5)	Pt1, Pt2, Pt21, Pt43, Pt50 , Pt54, Pt59, NT(n=1)	298, 242, 155, 1405	4 (6.4)	Pt16, Pt18, Pt50 , Pt64	242, 313, 654, 1284,
C	karbapenemi vsi ostali testirani betalaktami (CAZ, TZP, FEP)	9 (6.9)	Pt1, Pt2, Pt17, Pt42, Pt50, Pt52,	298, 242, 17, 111, 1403, 242	0 (0)		
D	karbapenemi nekateri od testiranih betalaktamov (CAZ, TZP, FEP) kinoloni	8 (6.1)	Pt1, Pt13, Pt21, Pt30, Pt39,	298, 270, 108, 245, 2589	0 (0)		
E	karbapenemi kinoloni	4 (3.1)	Pt1, Pt2, Pt8, Pt30	298, 17, 2605	0 (0)		
F	karbapenemi vsaj eden od aminoglikozidov	5 (3.8)	Pt12 , Pt37, Pt63, Pt62	309, 274, 395, 2604	3 (4.8)	Pt12 , Pt18, Pt45	309, 273
G	karbapenemi nekateri od testiranih betalaktamov (CAZ, TZP, FEP) vsaj eden od aminoglikozidov	6 (5.0)	Pt3, Pt5, Pt17, Pt21, Pt23, Pt68	242, 111, 235, 2588	0 (0)		
H	karbapenemi vsi ostali testirani betalaktami (CAZ, TZP, FEP) kinoloni	7 (5.4)	Pt1, Pt34, Pt44, Pt50, Pt70	298, 242, 235, 116, 2591	3 (4.8)	Pt47	

Skupina	Vzorec odpornosti (odporni proti)	Bolniki			Čistilne naprave		
		Izolati N (%)	Odgovarjajoči pulzotipi (130 sevov ^a)	Odgovarjajoči ST (61 sevov ^b)	Izolati N (%)	Odgovarjajoči pulzotipi (62 sevov ^c)	Odgovarjajoči ST (51 sevov ^b)
	vendar občutljivi za aminoglikozide						
I	karbapenemi kinoloni vsaj eden od aminoglikozidov	2 (1.5)	Pt31, Pt65	111,	0 (0)		
X	karbapenemi nekateri od testiranih betalaktamov (CAZ, TZP, FEP) kinoloni vsaj eden od aminoglikozidov	18 (13.8)	Pt5, Pt26, Pt31, Pt17 , Pt30, NT(n=2)	111, 235, 27	19 (30.6)	Pt10, Pt11, Pt12, Pt17 , Pt47, Pt29, , NT (n=2)	111, 654, 235, 309, 671

Legenda: ST = sekvenčni tip; a – posamičen izolat na bolnika, NT – izolata ni bilo možno tipizirati; pulzotipi zapisani s poudarjenim tipom pisave so bili osamljeni tako iz kliničnih in okoljskih vzorcev in so se pojavljali v istih rezistenčnih skupinah; b – vseh sevov, ki smo jim določili pulzotip nismo sekvencirali; c- vsi izolati iz istega vzorca z identičnim PFGE profilom so bili upoštevani kot identičen sev.

4.5 Ugotavljanje prisotnosti genov in regij, povezanih z odpornostjo

Pri 112 sevih, pri katerih smo sekvencirali celotni genom in ki so bili uvrščeni v 49 ST, smo s pomočjo dveh spletnih aplikacij ugotavljali prisotnost zapisov povezanih z odpornostjo *P. aeruginosa* proti zdravilom, ki se najpogosteje uporabljajo za zdravljenje psevdomonasnih okužb. Našli smo genske zapise za vse glavne mehanizme odpornosti: za encime, ki inaktivirajo protimikrobna zdravila (kot so cefalosporinaze, karbapenemaze in encimi, ki inaktivirajo aminoglikozide), za gene povezane s črpanjem protimikrobnih zdravil iz celic in za gene, ki so povezani s spremembo tarčnih mest za delovanje protimikrobnih zdravil (Tabela 4.6). Večina ugotovljenih genov ali mehanizmov odpornosti je bila prisotna pri vseh 112 analiziranih sevih. Izjeme so geni za karbapenemaze (16 % sevov), za mutacijo giraze (33 % sevov) in posamični geni za aminoglikozide inaktivirajoče encime – AME (*angl.*: aminoglycoside modifying enzymes).

Med geni, ki kodirajo encime za razgradnjo betalaktamov smo ugotavljali intrinzično prisotne cefalosporinaze (*angl.*: pseudomonas derived cephalosporinase – PDC) in gene, ki nosijo zapis za karbapenemaze (Tabela 4.6 in 4.7).

Od genov, ki nosijo zapise za znane karbapenemaze, smo našli izključno gene za karbapenemaze tipa VIM-1 in VIM-2 (*angl.*: Verona integron-encoded metallo- β -lactamase – VIM). Gene za VIM-1 smo našli pri dveh sevih, ki sta oba pripadala istemu ST (235) in sta izvirala iz bolnišnice in čistilne naprave. Gene za VIM-2 smo našli pri 16 sevih, ki so pripadali 3 različnim ST (111, 235 in 654). Večina sevov (13 od 16), ki so nosili gene za karbapenemaze tipa VIM-2, je izviralo iz čistilnih naprav (ST111, ST235, ST654). Iz bolnišnice smo osamili le tri take seve (ST111).

Med geni, ki nosijo zapise za AME je bil gen za kromosomalno fosfotransferazo prisoten pri vseh analiziranih sevih, drugi geni, ki kodirajo encime za inaktivacijo aminoglikozidov in so značilno prisotni na mobilnih genetskih elementih, pa so se pojavljali samo pri nekaterih sevih (Tabela 4.8). Pri določenem sevu je lahko prisotnih več AME. Skupno število sevov pri katerih smo ugotovili genske zapise za AME in se prenašajo z mobilnimi genetskimi elementi (*angl.*: mobile genetic elements – MGE) je bilo 25 (11 kliničnih in 14 okoljskih sevov).

Fenotipska odpornost se ne ujema z genotipsko določenim naborom genov za odpornost. Kljub temu, da ima kot je opisano zgoraj, večina sevov določene determinante za odpornost proti številnim antibiotikom, so sevi fenotipsko razvrščeni v deset različnih skupin glede na vzorec odpornosti (gl. poglavje 4.4 in Tabelo 4.5). Zato smo pri ST (N=7), ki so se pojavljali tako v

bolnišnici kot tudi v okolju, natančno primerjali skladnost med genskimi zapisi povezanimi z odpornostjo na protimikrobna zdravila in rezultati testiranja občutljivosti z disk-difuzijsko metodo (Priloga II – elektronski dokument v xls obliki). Ugotovili smo, da sama prisotnost genskega zapisa za določen mehanizem odpornosti ni nujno povezana z izražanjem tega tipa odpornosti. Dobro ujemanje smo ugotovili samo v primeru prisotnosti genov za karbapenemaze tipa VIM, ki so v vseh primerih povezane s fenotipično odpornostjo na karbapeneme in druge betalaktame, ter ob prisotnosti mutacij giraze (*gyrA*), ki je vedno povezana z odpornostjo proti kinolonom. V večini primerov so sevi, pri katerih smo dokazali gene za VIM, odporni proti predstavnikom vseh razredov protimikrobnih zdravil. Odpornosti proti aminoglikozidom tudi v primeru prisotnosti genov za AME, ki se prenašajo z MGE ni mogoče zanesljivo predvideti.

Tabela 4.6: Geni oz. skupine genov glede na mehanizme odpornosti, število sevov in sekvenčnih tipov z genskimi zapisi za določen mehanizem odpornosti, porazdelitev sevov in sekvenčnih tipov glede na vir (klinika/okolje) ter prekrivanje sekvenčnih tipov (sekvenčni tipi, ki smo jih osamili tako iz vzorcev vode čistilnih naprav kot iz kliničnih kužnin).

Mehanizem	ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN DRUGIM BETALAKTAMOM			ODPORNOST PROTI AMINOGLIKOZIDOM		ODPORNOST PROTI FLUOROKINOLONOM	
	ENCIMI INAKTIVACIJA – PDC ^a	VIM	IZLIVNE ČRPALKE ^b	ENCIMI INAKTIVACIJA ^c	IZLIVNE ČRPALKE	IZLIVNE ČRPALKA	SPREMEMBA TARČE ^d
Število sevov skupaj	112	18	112	112	112	112	37
Št. ST – skupaj	49	3	49	49	49	49	13
Št. sevov okolje	51	14	51	51	51	51	17
Št. ST – okolje	25	3	25	25	25	25	4
Število sevov klinika	61	4	61	61	61	61	20
Št. ST – klinika	31	2	30	30	30	30	11
Št. ST – prekrivanje	7	2	7	7	7	7	2
ST – prekrivanje	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	111, 235	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	111,235

- a) 11 različnih tipov gena za PDC ; b) 13 genov za izlivne črpalke, ki izločajo karbapeneme :MexA, MexB, MexP, MexQ, MexY, MexZ, NaIC, NaID, OpME, OprM, CpXr, ArmR, MexX; c) APH(3')-Iib, aadA6, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, aadA7, AAC(6')-Ib7, AAC(6')-Ib9, AAC(6')-Ib', AAC(6')-29b; d) GyrA in ParE

Tabela 4.7: Geni za psevdomonasne cefalosporinaze

Oznaka	Število kliničnih sevov	Število sevov iz ČN	% sevov - WGS	Skupina encimov
PDC-85	0	1	0,04	AmpC betalaktamaza
PDC-6	1	0	0,54	betalaktamaza razreda C
PDC-93	1	0	ni podatka	AmpC betalaktamaza (PDC-93)
PDC-9	1	1	5,82	betalaktamaza razširjenega spektra
PDC-10	3	4	16,34	betalaktamaza razreda C
PDC-1	4	4	5,63	betalaktamaza razreda C
PDC-8	6	1	11,06	betalaktamaza razreda C
PDC-2	6	11	5,4	betalaktamaza razširjenega spektra
PDC-5	8	2	18,25	betalaktamaza razširjenega spektra
PDC-7	15	11	8,73	betalaktamaza razreda C
PDC-3	17	19	27,76	betalaktamaza razširjenega spektra

Legenda: ČN = čistilne naprave; % sevov – WGS: delež sevov *P. aeruginosa*, kjer so pri analizi celotnega genoma našli encim (<https://card.mcmaster.ca> - The Comprehensive Antibiotic Resistance Database).

Tabela 4.8: Geni za AME pri analiziranih sevih

Gen	Skupno število sevov	Število kliničnih sevov	ST kliničnih sevov	Število okoljskih sevov	ST okoljskih sevov	Mesto v genomu (po literaturi)
<i>aph(3')-Iib</i>	112	61	vsi	51	vsi	kromosom
<i>aada6</i>	5	3	235, 253,2613	2	235, 2614	integron
<i>aph(3'')-Ib</i>	4	1	111	3	654	integron, plazmid, transpozon
<i>aph(6)-Id</i>	4	1	111	3	654	integron
<i>aada7</i>	1	1	253	0	253	integron
<i>aac(6')-Ib7</i>	4	3	235, 2605, 508	1	235	plazmid
<i>aac(6')-Ib9</i>	1	1	235	0		integron
<i>aac(6')-Ib'</i>	8	2	235	6	235	integron, plazmid, transpozon
<i>aac(6')-29a</i>	1	0		1	111	integron
<i>aac(3)-Ic</i>	4	0		4	235	integron
<i>aac(6')-Ib-hangzhou</i>	1	0		1	235	integron
<i>aac(6')-29b</i>	2	1	111	1	111	integron

Legenda: *APH(3')-Iib* = gen za kromosomalno aminoglikozidno fosfotransferazo; *aph(3'')-ib*, *aph(6)-id*, = geni za aminoglikozidno fosfotransferazo nameščeni na MGE; *aadA6*, *aadA7* = geni za aminoglikozidno nukleotidiltransferazo; *aac(6')-ib7*, *aac(6')-ib9*, *aac(6')-ib'*, *aac(6')-29a*, *aac(3)-ic*, *aac(6')-29b* = geni za aminoglikozidne acetiltransferaze;

4.6 Ugotavljanje prisotnosti genov in regij povezanih z virulenco

Pri 112 sevih, pri katerih smo določili sekvenco celotnega genoma in določili sekvenčne tipe, smo ugotavljali gene za posamične virulencne dejavnike. Znanе genske zapise za virulencne dejavnike (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Pseudomonas>) smo v genomih naših sevov iskali s pomočjo spletne aplikacije My DataBase Finder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MyDbFinder/>) (Tabela 4.9).

Genske zapise za fosfatazo, prekursor fosfolipaze C, elastazo in alginat smo našli pri vseh 112 sevih. Prekursor za eksotoksin A smo našli pri 111 sevih; nismo ga našli v genomu enega seva iz klinične kužnine.

Manj enakomerno razporejeni so bili geni za sekrecijske sisteme tipa III povezane z izločanjem eksotoksinov Y, U, T in S, vendar tudi vse skupine teh genov najdemo tako pri bolnišničnih kot okoljskih sevih (Tabela 4.9). Geni povezani s sekrecijskim sistemom za izločanje eksotoksina Y in T so navzoči pri vseh sekvenčnih tipih (vendar ne pri vseh sevih), medtem ko so geni

povezani s sekrecijskim sistemom za izločanje eksotoksina U in S povezani le z manjšim številom ST (14 oz. 36). V primerjavi z ostalimi skupinami genov kaže, da so se geni povezani s sekrecijskim sistemom tipa III za izločanje eksotoksina S relativno pogosteje pojavljali med kliničnimi sevi, geni povezani s sekrecijskim sistemom tipa III za izločanje eksotoksina T pa med okoljskimi sevi. Pri teh dveh skupinah genov je tudi najmanj izraženo prekrivanje sekvenčnih tipov.

Tabela 4.9.: Geni oz. skupine genov za virulenčne dejavnike, število sevov in sekvenčnih tipov z genskimi zapisi za določen virulenčni dejavnik, porazdelitev sevov in sekvenčnih tipov glede na vir (klinika/okolje) ter prekrivanje sekvenčnih tipov (sekvenčni tipi, ki smo jih osamili tako iz vzorcev vode čistilnih naprav kot iz kliničnih kužnin). Skupno smo analizirali genome 112 sevov (49 ST). ski zapisi za virulenčne dejavnike

	prekursor las-A proteaze	prekursor fosfolipaze C	prekursor exotoksin A	tip III exotoksin Y	tip III exotoksin U	tip III exotoksin T	tip III exotoksin S	elastaza	alginat
Število sevov	101	112	111	108	42	109	65	112	112
Število ST	48	49	49	49	14	49	36	49	49
Število sevov okolje (rel. delež - %) ^a	51 (100)	51 (100)	51 (100)	49 (96)	21 (41)	51 (100)	25 (49)	51 (100)	51 (100)
Število ST okolje (rel. delež - %) ^b	25 (92)	22 (81)	27 (100)	21 (78)	10 (37)	26 (96)	17 (63)	26 (96)	26 (96)
Število sevov klinika (rel. delež - %) ^c	50 (82)	61 (100)	60 (98)	59 (97)	21 (78)	58 (95)	40 (66)	61 (100)	61 (100)
Število ST klinika (rel. delež) ^d	30 (98)	30 (98)	31 (100)	30 (98)	7 (22)	30 (98)	28 (90)	31 (100)	22 (71)
Št. ST – prekrivanje	7	7	7	5	3	7	4	7	7
ST prekrivanje	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 244, 309	235, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 242, 244	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309	17, 111, 235, 242, 244, 253, 309

Legenda: a) relativni delež (%) sevov iz čistilnih naprav, kjer smo našli gene za posamične dejavnike virulence; b) relativni delež (%) ST iz čistilnih naprav, kjer smo našli gene za posamične dejavnike virulence; c) relativni delež (%) sevov iz bolnišnic, kjer smo našli gene za posamične dejavnike virulence; d) relativni delež (%) ST iz bolnišnic, kjer smo našli gene za posamične dejavnike virulence;

5. RAZPRAVA

5.1. Raznolikost genotipov v bolnišničnem okolju

Večino kliničnih izolatov smo osamili iz kužnin pridobljenih iz večje učne bolnišnice (122 sevov, 37 pulzotipov), medtem ko so bili proti karbapenemom odporni sevi *P. aeruginosa* osamljeni iz kužnin drugih zdravstvenih ustanov redki (5 sevov, 3 pulzotipi). To lahko razložimo z večjim številom kužnin iz večje učne bolnišnice, ter dejstvom, da je pojavljanje bakterij, ki so odporne proti protimikrobnim zdravilom bolj pogosto v večjih zdravstvenih ustanovah zaradi večjega števila dejavnikov tveganja (162, 163, 164, 165).

Le dva od pulzotipov iz kliničnih kužnin sta se pojavljala tako v večji učni bolnišnici, kot tudi v manjših zdravstvenih institucijah (Pt17 in Pt63). S tipizacijo MLST smo ugotovili, da vsi sevi pulzotipa Pt17 pripadajo istemu ST (ST111), kar nakazuje možnost medbolnišničnih prenosov teh sevov, medtem ko so sevi Pt63 pripadali različnim ST.

Prevladujoči pulzotipi proti karbapenemom odpornih *P. aeruginosa*, ki smo jih osamili iz kliničnih vzorcev (Pt1 in Pt17), so se v primerjavi z redkejšimi izolati pojavljajo bolj enakomerno glede na čas osamitve (Priloga III). Pri obeh najpogosteje osamljenih pulzotipih iz kliničnih vzorcev ugotavljamo tudi popolno ujemanje med PFGE in MLST (Pt1 = ST298, Pt17 = ST111), kar hkrati z enakomernim pojavljanjem čez celotno preiskovano obdobje kaže na endemičnost teh dveh sevov. Za razliko od njiju se redkeje izolirani pulzotipi pojavljajo le v posamičnih mesecih (4 meseci ali manj na leto).

Naši rezultati kažejo na to, da je raznolikost sevov v bolnišnicah precejšnja. Prevladovanje določenih tipov kaže na možnost endemične prisotnosti in medbolnišničnih prenosov. Drugi tipi pa se pojavljajo samo prehodno. Podobno situacijo opisujejo tudi druge študije (166, 167, 168). Takšna epidemiološka slika je v skladu s stalno prisotnostjo *P. aeruginosa* v bolnišničnem okolju.

5.2. Raznolikost genotipov v čistilnih napravah

Pojavljanje proti karbapenemom odpornih sevov med čistilnima naprava je bilo v primerjavi z bolnišnicama bolj enakomerno. Večje število proti karbapenemom odpornih izolatov iz večje čistilne naprave nakazuje možnost, da je velikost čistilne naprave povezana s pogostnostjo in raznolikostjo sevov *P. aeruginosa*. Ker pa nismo raziskovali dejavnikov, ki bi lahko vplivali na selekcijo proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* v čistilnih napravah, dejanskega vzroka ne moremo opredeliti.

Podobno kot pri kliničnih izolatih, tudi pri pulzotipih proti karbapenemu odpornih *P. aeruginosa*, ki smo jih osamili iz vzorcev čistilnih naprav, ugotavljamo pogostejše in glede na mesec izolacije bolj kontinuirano pojavljanje le za dva prevladujoča izolata (Pt10 in Pt16) (Priloga IV). Glede na ujemanje PFGE in MLST (Pt10 = 235, Pt16 = 313), ter kontinuirano izolacijo teh dveh sevov v večini mesecev, bi lahko sklepali, da sta seva endemična bodisi v čistilnih napravah ali pa v širšem okolju, ki ga čistilna naprava zajema.

5.3 Majhno prekrivanje genotipov med okoljskimi in kliničnimi sevi

Raziskave, ki so proučevale pojavljanje bakterij iz rodu *Pseudomonas* in natančneje vrste *P. aeruginosa* v okoljskih in kliničnih vzorcih ugotavljajo, da se sevi iz okolja in klinike prekrivajo le v manjši meri (11, 169, 170, 171, 172, 173). V teh študijah so upoštevali vse psevdomonase ne glede na občutljivost za protimikrobna zdravila. Za razliko od njih smo v naši raziskavi analizirali prekrivanje okoljskih in kliničnih izolatov pri *P. aeruginosa*, ki je odporen proti karbapenemom. Podobno kot so ugotovili z raziskavami pri *P. aeruginosa* osamljenih iz različnih okolij, ne glede na njegovo občutljivost za protimikrobna zdravila (170, 174, 175, 176), tako tudi mi ugotavljamo nizko stopnjo prekrivanja iz okoljskih in kliničnih vzorcev pri *P. aeruginosa*, ki so proti karbapenemom odporni.

Vse osamljene seve *P. aeruginosa* smo s PFGE razvrstili med 65 pulzotipov, med temi jih je bilo le 9 takšnih, ki smo jih našli na dveh ali več lokacijah (slika 4.1 in Priloga I). Med temi 9 pulzotipi se samo 4 pulzotipi pojavljajo tako pri bolnikih kot v okolju, le eden od teh (Pt17) se uvršča med tri prevladujoče pulzotipe.

Zanimiva je porazdelitev prevladujočih treh pulzotipov glede na izvor. Najpogosteje osamljeni pulzotip – Pt1 najdemo izključno med *P. aeruginosa*, ki smo ga osamili iz kužnin pridobljenih iz večje učne bolnišnice. Drugi najpogostejši pulzotip, Pt10, se med kliničnimi vzorci sploh ne

pojavlja, osamili smo ga le iz vzorcev čistilnih naprav. Na tretjem mestu je pulzotip Pt17, kot že omenjeno se pojavlja tako med kliničnimi kot okoljskimi vzorci.

Ugotavljamo torej nizko prekrivanje sevov iz različnih okolij, ki smo ga potrdili še z metodo tipizacije na osnovi celotnega genoma, kjer smo določili 49 različnih ST med 112 izbranimi sevi (Tabela 4.1 in Priloga I). Samo 10 MLST tipov najdemo hkrati pri kliničnih in okoljskih vzorcih. Vsi sekvencirani predstavniki najpogostejšega PFGE tipa v večji učni bolnišnici (Pt1) in večina sekvenciranih predstavnikov najpogostejšega PFGE tipa iz čistilnih naprav (Pt10) se uvršča v isti sekvenčni tip (Pt1 – ST298 oz. Pt10 – ST235).

V splošnem smo med pulzotipi in ST ugotavljali ujemanje (Tabela 4.1), ki pa ni bilo absolutno. Podobno skladnost z delnimi odstopanji pri tipizacije s PFGE in MLST za *P. aeruginosa* ugotavljajo tudi drugi avtorji (177, 178, 179, 180).

Med MLST tipi, ki smo jih določili med proti karbapenemom odpornimi sevi iz okolja in kliničnih kužnin, najpogosteje najdemo take, ki so znani kot uspešni večkratno odporni sevi, ki so razširjeni po svetu (ST111, ST235) (102, 177, 180, 181, 182, 183) in so jih našli tudi v naši soseščini (Hrvaška, Italija; (102, 177); Srbija; (184)). Ugotavljamo tudi proti karbapenemom odporne seve, ki so bili že predhodno opisani, vendar so geografsko omejeni na manjša področja (Španija, Francija, Madžarska, Češka; (178, 180, 185, 186), ter nekaj sevov z novimi ST.

5.4. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v fenotipskih vzorcih odpornosti na antibiotike

Rezultati raziskav, ki so primerjale odpornost proti protimikrobnim zdravilom med bolnišničnimi in okoljskimi sevi *P. aeruginosa*, si pogosto nasprotujejo. Nekateri avtorji opisujejo pogostejšo odpornost med bolnišničnimi sevi kot med okoljskimi, drugi navajajo nasprotno rezultate (23, 171, 175, 187). Visok delež proti antibiotikom odpornega *P. aeruginosa* v okolju je opisan v bazenskih vodah, neprečiščenih odplakah iz bolnišnic in v iztoku čistilnih naprav (149, 169, 188). Ti odporni okoljski izolati pogosto na molekularnem nivoju niso povezani s kliničnimi izolati, kljub temu pa predstavljajo potencialni rezervoar genetskih determinant, ki posredujejo odpornost (28, 189).

V naši raziskavi ugotavljamo, da se delež rezistentnih sevov med bolnišničnimi in okoljskimi sevi ne razlikuje bistveno. Hkrati pa je razvidno, da so vzorci odpornosti bolj raznoliki med kliničnimi kot pa okoljskimi sevi (Tabela 4.4 in Tabela 4.5). Vzrok za to bi lahko bili dejavniki

adaptivne odpornosti in različen vpliv selekcijskih dejavnikov. Sklepamo, da je vpliv selekcijskih dejavnikov znotraj bolnišnic bolj raznolik in spremenljiv kot v izvenbolnišničnem okolju, kar lahko povzroči povečano izražanje določenih intrinzično prisotnih genskih zapisov in sprememb v delovanju izlivnih črpalk ter sestave zunanje membrane. Tega v naši nalogi nismo proučevali.

Znotraj istega pulzotipa in MLST lahko najdemo različne vzorce odpornosti, podobno kot so poročali Gomila in sod. (190). Pt17 (ST111), ki je edini pulzotip, ki smo ga našli na več kot treh lokacijah, se je uvrstil v 4 različne skupine glede na vzorec odpornosti. Pri sevih istega pulzotipa in ST iz okolja in klinike lahko najdemo različno ali isto odpornost. Kadar imajo sevi isto odpornost in pripadajo tudi istemu ST to kaže na možnost prehajanja teh sevov med izvenbolnišničnim in bolnišničnim okoljem.

Prevladujoči pulzotipi so na različne načine porazdeljeni po vzorcih odpornosti. Najpogostejši in izključno klinični pulzotip Pt1 najdemo v 5 od 10-tih vzorcev odpornosti, vendar ga ne najdemo v skupini, kjer se pojavlja odpornost proti vsem 4 skupinam protimikrobnih zdravil, ki smo jih testirali.

5.5. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v prisotnosti genov za odpornost na antibiotike

Geni povezani z intrinzično in adaptivno odpornostjo (Tabela 2.2) so praviloma prisotni pri vseh analiziranih sevih proti karbapenemom odpornih *P. aeruginosa*. Gene povezane s pridobljeno odpornostjo, kot so geni povezani s spremembami giraze, geni, ki kodirajo karbapenemaze in nekateri geni za AME, pa najdemo le pri določenih sevih. (Tabela 4.6).

Odpornost proti beta laktamskim antibiotikom je pri *P. aeruginosa* posredovana s tremi poglavitnimi mehanizmi: encimi, ki betalaktame razgradijo (intrinzična – cefalosporinaze, pridobljena – karbapenemaze), izlivnimi črpalkami, ki poleg drugih substratov iz celice lahko črpajo betalaktamske in druge antibiotike (adaptivna) ter zmanjšano prepustnostjo celične membrane oz. celične stene za antibiotike (intrinzična, adaptivna).

Prvi dve skupini mehanizmov smo v naši raziskavi iskali in tudi potrdili. Pri vseh sevih so prisotni geni za encime – PDC, ki hidrolizirajo betalaktame (Tabela 4.8). Posamični tipi PDC so dokaj enakomerno porazdeljeni med bolnišničnimi in okoljskimi sevi. Najpogostejši tip PDC

(PDC-3), ki smo ga ugotovili, je tip, ki je tudi sicer največkrat dokazan pri sevih *P. aeruginosa* z znano sekvenco celotnega genoma (<https://card.mcmaster.ca/>).

Druga skupina encimov, ki razgradijo betalaktame in smo jih v naši raziskavi ugotovili pri 18 sevih (16 %), so karbapenemaze. Sevi, ki nosijo genski zapis za karbapenemaze so bili uvrščeni med 6 pulzotipov oz. 3 ST. Vsi trije ST pri katerih smo našli gene z zapisom za VIM-1 in VIM-2 (ST111, ST235 in ST654) se v literaturi pogosto povezujejo z večkratno odpornimi sevi *P. aeruginosa* osamljenimi iz različnih kužnin. Pogosto se pojavljajo tudi v sosednjih državah (Hrvaška, Italija; (102, 177, 191). VIM-2 velja za najbolj razširjeno MBL pri bakteriji *P. aeruginosa*, prevladoval je tudi med našimi sevi.

Gene, ki nosijo zapis za MBL skupine VIM, smo našli tako pri sevih iz kliničnih kužnin (6,5 % sevov kot tudi pri tistih iz okoljskih vzorcev (27 % sevov). Večji delež večkratno odpornih sevov) med okoljskimi vzorci bi lahko bil posledica koselekcije. Znano je, da se nekateri dejavniki odpornosti proti kemičnim in fizikalnim vplivom prenašajo skupaj z genskimi zapisi za MBL. Tak primer so geni, ki posredujejo odpornost proti težkim kovinam, ki pa jih v naši raziskavi nismo iskali (192).

Podobno kot gene za intrinzično prisotne betalaktamaze, smo tudi gene za izlivne črpalke povezane z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom dokazali pri vseh sevih, pri katerih smo določali nukleotidno zaporedje genoma. Prispevek izlivnih črpalk k rezistenčnemu fenotipu je povezan s spremembami v regulaciji izražanja teh črpalk, česar pa v naši nalogi nismo proučevali.

Gene, ki nosijo zapise za inaktivacijo aminoglikozidnih antibiotikov (AME; ang.: Aminoglycoside Modifying Enzymes) smo ugotovili pri vseh analiziranih sevih (Tabela 4.9). Vendar se pri vseh analiziranih sevih pojavlja le kromosomalna fosfotransferaza, medtem ko se ostali AME pojavljajo le pri posameznih sevih (Tabela 4.8). Kromosomalna fosfotransferaza je tudi po podatkih povzetih iz spletne strani The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca>) prisotna pri 89,59 % sevov *P. aeruginosa*. Za gene ostalih AME, ki se pojavljajo le pri posameznih sevih, pa ugotavljamo, da so povezani z določenimi sekvenčnimi tipi (ST111, ST235, ST253, ST508, ST654, ST2605, ST2613, ST2614). Skupno število sevov pri katerih smo ugotovili genske zapise za AME in predvidevamo, da se prenašajo z MGE, je bilo 25 (11 iz kliničnih kužnin in 14 iz okoljskih vzorcev). Te gene pri *P. aeruginosa*

običajno dokažejo na plazmidih ali integronih, ki so povezani z večkratno odpornostjo (2, 193, 194, 195). Skladno s tem, smo jih tudi mi dokazali pri večkratno odpornih sevih. Ne preseneča, da jih najdemo pri vseh sevih, ki nosijo zapis za karbapenamaze (ST111, ST235, ST654), saj vemo, da je tudi ta zapisan v integronih.

Gene, ki posredujejo zapise za izlivne črpalke za črpanje aminoglikozidov iz celice, smo našli brez izjeme pri vseh okoljskih in kliničnih sevih. Podobno kot pri odpornosti proti betalaktamom, je tudi tukaj za nastanek odpornega rezistotipa pomembna sprememba v izražanju teh črpalk.

Odpornost proti kinolonom je pri *P. aeruginosa* posredovana s spremembo encima giraze, oziroma topoizomeraze, ali pa s črpanjem kinolona iz celice. Spremembo tarče smo ugotovili pri 37 od 112 analiziranih sevov (33 %), v enakem deležu med kliničnimi in okoljskimi sevi. Gene za izlivne črpalke, ki lahko črpajo kinolone iz celice smo našli pri vseh sevih.

5.6. Razlike med ugotovljeno genotipsko in fenotipsko odpornostjo

Skladnost med genskimi zapisi povezaninimi z odpornostjo na protimikrobna zdravila in rezultati testiranja občutljivosti z disk-difuzijsko metodo smo primerjali pri sedmih ST (46 sevov), ki so se pojavljali tako v bolnišnici kot tudi v okolju (Priloga II).

Genske zapise za izlivne črpalke, ki poleg drugih zdravil izločajo betalaktame, kinolone in aminoglikozide, smo potrdili pri vseh sevih, vendar to ni nujno pomenilo odpornosti na te skupine zdravil. Znano je, da so izlivne črpalke (teh je več vrst) pomembne pri intrinzični odpornosti *P. aeruginosa* na protimikrobna zdravila, prispevajo pa tudi k razvoju večkratne odpornosti (196, 197). Vendar ugotavljajo, da je povečano izražanje izlivnih črpalk povezano z zmanjšano preživetveno sposobnostjo bakterije in tudi z manjšo virulenco. Zato domnevamo, da se povečano izražanje teh genov pojavlja le kadar je za preživetje nujno potrebno in je posledično pod nadzorom regulacijskih mehanizmov (198, 199).

Encime PDC smo našli pri vseh analiziranih sevih. Pseudomonasne cefalosporinaze so običajno kromosomalno kodirane in prispevajo k odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom. Sem sodijo tudi nekateri encimi iz skupin AmpC in ESBL. Substratna specifičnost in stopnja odpornosti, ki jo posredujejo se med posamični encimi razlikuje in se lahko spreminja zaradi prisotnosti induktorjev ali mutacij (Rodriguez-Martinez, Poirel in Nordmann, 2009). Zaradi

tega sama prisotnost gena ne pomeni nujno že odpornosti na vse betalaktame, kar smo opazili tudi pri naših izolatih.

Od karbapenemaz smo našli le karbapenemaze VIM, ki kot večina karbapenemaz (razen GES), ki jih najdemo pri *P. aeruginosa*, sodijo med MBL. Vsi sevi z VIM so bili tudi fenotipsko večkratno odporni (proti vsem testiranim razredom antibiotikov) in so se značilno pojavljali pri ST235 in ST111, ki sodita med visoko-rizične in globalne seve *P. aeruginosa* (Mulet X in sod., 2013). MBL so povezane z visokimi minimalnimi inhibitorynimi koncentracijami za karbapeneme in hidrolizirajo vse betalaktame, razen aztreonama (Gupta, 2008; Kali in sod., 2013).

V povezavi z encimsko odpornostjo proti aminoglikozidom, smo našli različne vrste AME. Pri vseh sevih smo našli aminoglikozidno fosfotransferazo - APH(3')-IIb, ki je kromosomalno kodirana. Našli so jo pri 98,95 % sevov, ki so jih analizirali z WGS (<https://card.mcmaster.ca> - The Comprehensive Antibiotic Resistance Database). Ostali AME so kodirani na MGE (*angl.*: mobile genetic elements – MGE) in se pojavljajo pri posamičnih sevih (Tabela 4.7 in Priloga II). Ugotavljamo, da sama prisotnost AME ne pomeni vedno fenotipsko izražene odpornosti proti aminoglikozidom. Fenotipično odpornost proti aminoglikozidom pa najdemo pri vseh sevih, ki imajo tudi gene za VIM. Domnevamo, da so v teh primerih geni locirani na integronih in verjetno tudi pod nadzorom skupnega operona (204, 205).

Odpornost proti kinolonom, ki jo posredujejo mutacije *gyrA* in *parE* smo med sevi, ki smo jih opisali v okolju in bolnišnici našli pri dveh ST (ST235, ST111). Pri obeh sevih smo ugotovili rezistenco proti vsem razredom testiranih zdravil. Med vsemi sevi, ki smo jih analizirali z WGS smo našli mutacijo *gyrA* pri 37 sevih (33 %) in *parE* pri le 2 sevih (1,8 %). Podobno na spletni strani <https://card.mcmaster.ca> -The Comprehensive Antibiotic Resistance Database za ta dva gena navajajo ugotovljeno prevalenco 28,07 % oz. 2,02 %. Prisotnost mutacij v teh dveh regijah pri naših sevih je bila vedno povezana z odpornostjo proti ciprofloksacinu.

Ugotavljamo lahko, da se fenotipska in genotipska odpornost ne ujemata vedno. Pri fenotipski odpornosti zmeraj najdemo potencialne gene za odpornost vsaj na nivoju izlivnih črpalk, vendar v raziskavi nismo dokazovali njihove dejanske vloge pri odpornosti. Prisotnost genov, ki posredujejo mehanizme odpornosti pri *P. aeruginosa*, ne pomeni nujno fenotipske odpornosti. Zlasti to velja za izlivne črpalke in gene za PDC. Vzrok vidimo v tem, da je izražanje odpornosti pogosto regulirano in vezano na prisotnost določenih induktorjev ali pa povezano z mutacijami v regulatornih genih (198, 199). Od tega odstopa odpornost, ki jo posredujejo geni za VIM, v

teh primerih je fenotipska odpornost vedno izražena. Geni za VIM se nahajajo na integronih, zato imajo velik razširitveni potencial. Praviloma so pogosto v bližini genov, ki posredujejo odpornost proti drugim zdravilom (aminoglikozidi, kinoloni ...), kar se fenotipsko izraža kot večkratna odpornost (204, 205). Tudi vsi naši izolati, ki so imeli gene za VIM, so bili odporni proti vsem razredom testiranih protimikrobnih zdravil.

5.7. Razlike med okoljskimi in kliničnimi sevi v dejavnikih virulence

Glede prisotnosti genov za dejavnike virulence pri posameznem sevu se *P. aeruginosa* razlikuje od nekaterih drugih po Gramu negativnih oportunističnih patogenov. Tako so, npr. pri *E. coli*, geni, ki nosijo zapise za dejavnike virulence povezani samo z določenimi patogenimi sevi (206, 207, 208), medtem ko pri *P. aeruginosa* praviloma najdemo večino genov povezanih z virulenco pri vseh sevih. Stopnja in način izražanja le teh pa se spreminja glede na okolje (21, 209). S tem se ujemajo tudi naši rezultati kjer ugotavljamo, da so genetski dejavniki virulence, ki smo jih iskali, prisotni pri večini sevov.

Tako smo pri vseh sevih našli gene za prekurzor hemolitične fosfolipaze C, elastazo in alginat, prav tako smo pri vseh sevih, razen pri enem iz kliničnega vzorca, našli tudi prekurzor za eksotoksin A. Prevalenca gena za LasA se je deloma razlikovala med okoljskimi (82%) in kliničnimi sevi (100 %). Med geni za eksotoksine, ki so povezani s sekrecijskim sistemom tipa III smo našli visoko prevalenco genov za ExoT in ExoY tako med sevi iz kliničnega okolja (95 oz. 97 %), kot med tistimi iz čistilnih naprav (100 oz. 96 %) (Poglavje 4.6, Tabela 4.8). Podobno visoko prevalenco navedenih virulenčnih genov opisujejo tudi nekateri drugi avtorji (210, 211, 212).

Manj enakomerno sta bila razporejena samo gena za ExoS in ExoU. Praviloma se prisotnost teh dveh genov pri isti bakteriji izključuje (23, 102, 212, 213), izjemoma pa, podobno kot mi, navajajo tudi seve pri katerih sta prisotna oba (102, 214). Oba gena hkrati smo našli le pri enem izolatu iz čistilne naprave. Prevalenca gena *exoU* med okoljskimi izolati je bila 41 %, med kliničnimi pa 78 %. Prevalenca gena *exoS* je med okoljskimi izolati znašala 49 % in med kliničnimi izolati 66 %. Podobno prevalenco gena *exoU* med okoljskimi izolati opisujejo tudi Kaiser in sod., navajajo pa nižjo prevalenco teh genov med kliničnimi izolati (30-42 %) (212).

Višji delež sevov z genoma *exoU* in *exoS* med kliničnimi sevi se sklada s funkcijo teh genov. Tako ExoS kot ExoU sta pomembna za kolonizacijo, invazivnost in razsoj okužbe. Vendar ExoU, ki je fosfolipaza z močnim citotoksičnim učinkom, nekateri povezujejo s huje potekajočimi invazivnimi okužbami (215, 216, 217).

Prevalenca genov kot smo jo našli pri naših izolatih, je v skladu z ugotovitvijo, da je večina genov za virulenco pri *P. aeruginosa* umeščena v osrednji genom bakterije in jih posledično najdemo pri večini sevov, ne glede na njihov izvor (218, 220).

6. ZAKLJUČKI IN POTRDITEV HIPOTEZ

V naši nalogi smo postavili naslednje hipoteze:

- **proti karbapenemom odporni sevi osamljeni iz iztoka čistilnih naprav bodo le deloma podobni proti karbapenemom odpornim sevom iz kužnin (tako po mehanizmih odpornosti proti karbapenemom kot po naboru virulenčnih dejavnikov)**

S tipizacijo PFGE in MLST smo ugotovili še nižjo nizko stopnjo prekrivanja med sevi iz bolnišničnega okolja in sevi iz čistilnih naprav od pričakovane. Med pulzotipi iz bolnišnic in čistilnih naprav, ki se prekrivajo, pa ugotavljamo skladnost med pulzotipom in MLST, kar nakazuje na možnost prehajanja teh tipov med bolnišničnim in izvenbolnišničnim okoljem. MLST tipizacija je bila narejena prvič za seve iz Slovenije, kar daje možnost, da so ti sedaj tudi mednarodno primerljivi.

Zaradi verjetne izpostavljenosti različnim selektivnim dejavnikom smo domnevali, da si bodo okoljski in bolnišnični sevi *P. aeruginosa* le delno podobni kar se tiče mehanizmov odpornosti. Delež odpornih sevov je v splošnem visok v obeh okoljih, nakazujejo se razlike na nivoju posamičnih antibiotikov, hkrati pa opazamo, da so vzorci odpornosti bolj raznoliki med kliničnimi kot pa okoljskimi sevi. Za to bi lahko bili odgovorni dejavniki adaptivne odpornosti. Sklepamo lahko (vendar tega nismo proučevali), da je vpliv selekcijskih dejavnikov v bolnišničnem okolju bolj pester in spremenljiv kot v izvenbolnišničnem okolju, kar lahko privede do povečanega izražanja določenih intrinzično prisotnih genskih zapisov in sprememb v delovanju izlivnih črpalk ter sestave zunanje membrane.

Tudi glede nabora virulenčnih dejavnikov med kliničnimi in okoljskimi sevi ne ugotavljamo pomembnih razlik, prevalenca genov, ki smo jo ugotavljali pri analiziranih sevih je v splošnem enakomerna, kar je skladno z ugotovitvijo, da so ti geni nameščeni v osrednjem genomu *P. aeruginosa*. Manjšo razliko ugotavljamo le pri genih za eksotoksine, kjer je nekoliko večja prevalenca genov za eksotoksine S in U med kliničnimi sevi. To je mogoče povezano z vlogo teh dveh eksotoksinov pri patogenezi.

- **le manjši delež odpornosti proti karbapenemom bo posredovan z izločanjem karbapenemaz in te se bodo kot mehanizem odpornosti pojavljale pri večkratno odpornih sevih.**

Hipotezo smo potrdili. Karbapenemaze smo našli pri 6,5 % kliničnih in 27 % okoljskih sevov. Sevi, ki so nosili gene za karbapenemaze so fenotipično sodili med večkratno odporne seve. Pri njih smo poleg karbapenemaz potrdili tudi gene za AME, ki se prenašajo z MGE. Te genetske determinante so *P. aeruginosa* nameščene na integronih. Vsi sevi pri katerih smo našli gene za karbapenemaze so imeli tudi mutacije v genih za girazo.

- **pojavljale se bodo predvsem karbapenemaze iz skupine VIM, ki jih sicer opisujejo tudi v bližnjih državah**

Hipotezo smo potrdili. Potrdili smo gene za karbapenemaze tipa VIM in sicer dva podtipa: VIM-1 (dva seva, oba ST253, en sev iz bolnišnice, en sev iz čistilne naprave) in VIM-2 (16 sevov, večina sevov 13 je izvirala iz čistilnih naprav, uvrščeni so bili v 3 ST: 111, 235, 654; le 3 sevi so izvirali iz bolnišnic, vsi trije ST111). VIM-2 velja za najbolj razširjeno MBL pri *P. aeruginosa* v Evropi, drugod po svetu in tudi v naši soseščini.

ST pri katerih smo potrdili VIM karbapenemaze se v literaturi pogosto povezujejo z večkratno odpornimi sevi, pri nas smo jih našli tako med kliničnimi, še pogosteje pa med okoljskimi sevi.

7. POVZETEK

Pseudomonas aeruginosa je oportunistična patogena bakterija. Okužbe povzročajo zlasti pri osebah z okrnjeno lokalno ali sistemsko odpornostjo in v povezavi z zdravljenjem. (28). *P. aeruginosa* je intrinzično odporen proti številnim protimikrobnim zdravilom, intrinzični odpornosti pa se pogosto pridruži še pridobljena. Zaradi tega je za zdravljenje psevdomonasnih okužb na voljo zelo omejen izbor zdravil (3, 5). Karbapenemi, ki imajo širok spekter delovanja, so zdravilo izbora za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa* odporen proti ostalim protipsevdomonasnim učinkovinam. Vendar se v vse večjem obsegu pri *P. aeruginosa* pojavlja odpornost tudi proti karbapenemom. V Sloveniji je leta 2014 znašal delež sevov *P. aeruginosa*, ki so bili neobčutljivi za imipenem ali meropenem, 12 oz. 17 % (42), delež proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* med invazivnimi sevi pa je leta 2014 znašal 31,3 % (44).

P. aeruginosa je nezahtevna bakterija in je prisoten v številnih okoljih. Vir okužb s *P. aeruginosa* v bolnišničnem okolju je pogosto povezan z vodovodnimi odtoki (7, 8, 9, 10), od koder pa bi lahko bakterija prehajala v komunalni sistem odpadnih vod in v vode čistilnih naprav (11, 12).

Naš namen je bil ugotoviti ali proti karbapenemom odporne seve *P. aeruginosa*, ki jih osamimo iz kužnin bolnikov, najdemo tudi v okolju in kako pogosti so ti sevi. Zanimala nas je sočasna odpornost pri kliničnih sevih in sevih iz čistilnih naprav, ter kako so sevi iz teh virov podobni na molekularnem nivoju.

Predvidevali smo, da bodo glede mehanizmov odpornosti in naboru virulenčnih dejavnikov proti karbapenemom odporni sevi, ki jih bomo osamili iz čistilnih naprav, le deloma podobni proti karbapenemom odpornim sevom iz kužnin. Glede mehanizmov odpornosti smo domnevali, da bo le manjši del proti karbapenemom odpornih sevov imel genetske determinante za karbapenemaze, ki se bodo pojavljale pri večkratno odpornih sevih, ter da bodo v večini primerov to karbapenemaze iz skupine MBL, ki se sicer pojavljajo tudi v sosednjih državah.

Proti karbapenemom odporne seve *P. aeruginosa* iz kliničnih vzorcev smo iskali v kužninah dihal in vzorcih urina, medtem ko smo proti karbapenemom odporne seve iz čistilnih naprav osamili iz vzorcev, ki smo jih odvzeli iz odtoka čistilne naprave. Skupaj je bilo v raziskavo zajetih 8 zdravstvenih ustanov: večja učna bolnišnica (približno 1.300 postelj, okoli 55.000 letnih odpustov), manjša regionalna bolnišnica (260 postelj, 13.000 letnih odpustov) in 6 splošnih ali specializiranih ambulant, ki pošiljajo kužnine na mikrobiološke preiskave v OMM CMM NLZOH. Kužnine smo obdelali po standardnih navodilih za delo. Seve iz okolja smo osamili iz vzorcev, ki smo jih v obdobju enega leta enkrat mesečno odvzeli ob iztoku dveh mehanično-bioloških čistilnih naprav. Letni pretok večje znaša $11.000 \times 10^6 \text{ m}^3$, letni pretok

manjše je $5.212 \times 10^6 \text{ m}^3$. V večjo čistilno napravo se zliva tudi odpadna voda iz večje učne bolnišnice, ki smo jo vključili v raziskavo, v manjšo pa iz manjše regionalne bolnišnice. Seve iz čistilnih naprav smo osamili s pomočjo bakteriološkega filtra ($0,45 \mu\text{m}$) in inkubacijo na selektivnem gojišču (cetrimid in $4 \mu\text{g}$ imipenema na ml gojišča) $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Testiranje občutljivosti smo izvajali z disk difuzijsko metodo (<http://www.eucast.org>). Povezavo med izolati smo potrjevali retrogradno tako, da smo s PFGE (pulzno gelsko elektrogorezo) določili pulzotipe. Iz vsakega pulzotipa smo nato izbrali enega ali več predstavnikov, pri katerem smo ugotavljali celotno nukleotidno zaporedje genoma. Na osnovi tega smo izvedli MLST tipizacijo in iskali genske zapise povezane z odpornostjo in dejavniki virulence.

Skupaj smo iz kliničnih in okoljskih sevov osamili 213 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*, ki smo jih razvrstili v 65 pulzotipov. Pri 109 bolnikih smo osamili 130 proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa*. Skupno smo v obdobju od 1.1.2014 do 31.12.2014 osamili *P. aeruginosa* iz kužnin dihal in urina pri 558 bolnikih, torej je delež proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* med bolniki znašal 19,5 %. To je sicer nekoliko več kot v celotni slovenski populaciji v istem časovnem obdobju (SKUOPZ: 12-16 %), kar je pa razumljivo glede na vir kužnin (večinoma večja učna bolnišnica in oddelki intenzivnega zdravljenja).

Proti karbapenemom odporne seve smo osamili iz kužnin, ki so jih poslali iz 4 od 8 vključenih zdravstvenih ustanov. Večina sevov je izvirala iz večje učne bolnišnice (125 sevov). To lahko pojasnimo z večjim številom kužnin iz večje učne bolnišnice in dejstvom, da je pojavljanje bakterij, ki so odporne proti protimikrobnim zdravilom, pogostejše v večjih zdravstvenih ustanovah zaradi večjega števila dejavnikov tveganja pri težjih bolnikih (162, 164, 165). Med 130 kliničnimi sevi nam je uspelo s PFGE tipizirati 127 sevov, ki smo jih uvrstili v 38 pulzotipov. Razen enega so bili vsi prisotni v večji učni bolnišnici, medtem ko smo v ostalih zdravstvenih institucijah osamili 5 sevov, ki smo jih razvrstili v 3 pulzotipe. Med kliničnimi sevi je prevladoval pulzotip Pt1, ki smo ga osamili v 57 primerih (45,6 % izolatov), vendar se je pojavljal samo v večji učni bolnišnici. S tipizacijo MLST (N=9) je bilo vseh 9 analiziranih sevov tega pulzotipa uvrščenih v ST298. Ta ST nekateri avtorji povezujejo z večkratno odpornimi sevi (219, 220, 221). Pri nas je Pt1 imel različne rezistenčne vzorce, vendar ga ne najdemo v skupini z odpornostjo na največ skupin antibiotikov. Drugi pulzotipi so zajemali od enega do osem izolatov. Le dva pulzotipa iz kliničnih kužnin sta se pojavljala tako v večji učni bolnišnici, kot tudi v manjših zdravstvenih ustanovah (Pt17 in Pt63). S tipizacijo MLST smo ugotovili, da sevi Pt17 pripadajo istemu ST (ST111), medtem ko so se sevi Pt63 uvrščali med

različne ST. Prevladujoča klinična pulzotipa Pt1 in Pt17 sta pojavljala enakomerno čez celotno obdobje glede na čas osamitve, kar skupaj z dejstvom, da se popolnoma ujemata tudi glede MLST tipizacije (Pt1=ST298, Pt17=ST111), nakazuje možnost medbolnišničnih prenosov oz. v primeru Pt17, ki smo ga osamili tudi iz obeh čistilnih naprav možnost prenosa med bolnišničnim in izvenbolnišničnim okoljem.

Iz čistilnih naprav smo osamili 83 proti karbapenemu odpornih sevov, 81 sevov smo razvrstili v 31 pulzotipov. Iz večje čistilne naprave smo osamili 61 sevov (59 tipiziranih v 26 pulzotipov). Iz manjše čistilne naprave smo osamili 22 sevov (11 pulzotipov). Podobno kot v primeru bolnišničnega okolja tudi tukaj ugotavljamo prevlado posamičnega pulzotipa – Pt10 (18 izolatov - 21,7 %). Med preostale pulzotipe se je razporedilo od enega do devet izolatov. Lahko bi sklepali, da je pogostnost in raznolikost sevov *P. aeruginosa* povezana z velikostjo čistilne naprave, vendar dejavnikov, ki bi vplivali na selekcijo proti karbapenemu odpornih *P. aeruginosa* v čistilnih napravah nismo raziskovali, zato povezave ne moremo potrditi. Podobno kot pri bolnišničnih izolatih tudi pri okoljskih sevih le v primeru dveh prevladujočih Pt (Pt10, Pt16) opazamo kontinuirano pojavljanje. Prav tako pri njiju opazamo popolno ujemanje med pulzotipi in tipi MLST (Pt10 = ST235, Pt16 = ST313). Glede na oboje sklepamo, da sta seva endemična v čistilnih napravah, oz. širšem okolju, ki ga čistilni napravi zajemata.

Dveh najpogostejših Pt iz okolja med kliničnimi sevi ne najdemo. Kot so odkrili drugi avtorji pri pojavljanju *P. aeruginosa* v splošnem iz različnih okolij, ugotavljamo za *P. aeruginosa*, ki je odporen proti karbapenemu, nizko stopnjo prekrivanja med okoljskimi in kliničnimi vzorci. Od 65 ugotovljenih pulzotipov se jih samo 9 pojavlja na dveh ali več mestih in le 4 najdemo tako med bolnišničnimi, kot tudi okoljskimi sevi. Samo eden od njih (Pt17) se uvršča med tri prevladujoče pulzotipe (Pt1, Pt, 10, Pt17), to je tudi edini pulzotip, ki smo ga našli na 4 različnih lokacijah (velika in manjše bolnišnica in obe čistilni napravi).

Nizko stopnjo prekrivanja med sevi iz različnih virov potrjuje tudi tipizacija na osnovi analize celotnega genoma. Pri izbranih 112 sevih (61 sevov iz kužnin, 51 sevov iz čistilnih naprav) smo izvedli MLST tipizacijo in določili ST. Že znane ST smo določili pri 98 sevih, pri 14 sevih pa smo določili 12 MLST tipov, ki še niso imeli dodeljenega ST. Na podatkovni bazi PubMLST database so jim dodelili nove ST: 2416, 2585, 2587–2591, 2604, 2605, 2613–2615. Samo 10 MLST najdemo hkrati med kliničnimi in okoljskimi vzorci. Prav tako pa ne opazimo kopičenja sevov v skupine, ki bile specifično klinične oz. vezane za čistilne naprave. Med pulzotipi in ST opazamo ujemanje, vendar to ni absolutno, podobno kot ugotavljajo tudi drugi

avtorji (177, 178, 179, 180) Med MLST tipi, ki smo jih določili pri proti karbapenemom odpornih sevih iz okolja in kliničnih kužnin, najpogosteje najdemo take, ki so znani kot uspešni, večkratno odporni sevi, ki so razširjeni po svetu (ST111, ST235) (102, 177, 180, 182, 183) in so jih našli tudi v naši soseščini (Hrvaška, Italija; (102, 177)). Ugotavljamo tudi proti karbapenemom odporne seve, ki so bili že predhodno opisani, vendar so geografsko omejeni na manjša področja (178, 180, 185, 186), ter nekaj sevov z novimi ST.

Občutljivost proti karbapenemom odpornih sevov *P. aeruginosa* za protimikrobna zdravila smo testirali z disk difuzijsko metodo pri 130 sevih (109 bolnikov, 83 izolatov iz ČN). Pri analizi kliničnih sevov smo upoštevali en (prvi) izolat pri bolniku, razen kadar se je občutljivost zaporednih izolatov razlikovala. Pri izolatih iz čistilnih naprav smo v analizo vključili za vsak pulzotip le po en reprezentativni sev za vsako mesečno vzorčenje. S tem smo število sevov iz čistilnih naprav, ki smo jih vključili v analizo, zmanjšali iz 83 na 62. Glede odpornosti proti posamičnim antibiotikom ugotavljamo visok delež odpornosti proti kombinaciji piperacilina s tazobaktamom (52,3 %) in proti ceftazidimu (42,3 %) pri sevih, ki smo jih osamili iz kliničnih kužnin, medtem ko pri sevih, ki smo jih osamili iz vod čistilnih naprav, ugotavljamo visok delež odpornosti proti ceftazidimu (37,1 %), ciprofloksacinu (35,5 %) in aminoglikozidom.

Seve smo glede na vzorce odpornosti razdelili v 10 skupin. Večina sevov (47/130 med kliničnimi in 33/61 med okoljskimi) je bila odporna izključno proti karbapenemom. V nasprotju s tem druga največja skupina vključuje seve, ki so odporni proti 4 različnim skupinam antibiotikov. Klinični sevi so kazali večjo pestrost odpornosti, saj so prisotni v vseh 10 skupinah, medtem ko okoljske seve najdemo le v 5 skupinah. Delež rezistentnih sevov se med bolnišničnimi in okoljskimi ne razlikuje bistveno, vidimo pa, da so vzorci odpornosti bolj raznoliki med kliničnimi kot pa okoljskimi sevi. Za to bi lahko bili odgovorni dejavniki adaptivne odpornosti. Sklepamo lahko (vendar tega nismo proučevali), da je vpliv selekcijskih dejavnikov v bolnišničnem okolju bolj pester in spremenljiv kot v izvenbolnišničnem okolju, kar lahko privede do povečanega izražanja določenih intrinzično prisotnih genskih zapisov in sprememb v delovanju izlivnih črpalk ter sestave zunanje membrane.

Prevladujoči pulzotipi so po vzorcih odpornosti porazdeljeni na različne načine. Tako prevladujoči pulzotip Pt1 (ST298) najdemo v 5 od 10-tih vzorcev odpornosti, ne najdemo ga pa v skupini z odpornostjo proti vsem 4 razredom protimikrobnih zdravil, ki smo jih testirali. Znotraj istega pulzotipa in tipa MLST lahko najdemo različne vzorce odpornosti. Pt17 (ST111)

– edini pulzotip, ki smo ga našli na več kot treh lokacijah, se je glede na vzorec odpornosti uvrstil v 4 skupine.

Pri sevih istega pulzotipa iz okolja in klinike lahko najdemo različno ali tudi isto fenotipično odpornost, zadnje kaže na možnost prehajanja teh sevov med izvenbolnišničnim in bolnišničnim okoljem.

Pri vseh 112 sevih, pri katerih smo določili sekvenco celotnega genoma, smo s spletnimi aplikacijami (Resfinder 2.1 web-service in Comprehensive Antibiotic Resistance Database) pri našli genske zapise za glavne mehanizme odpornosti. Pričakovano smo pri vseh sevih potrdili gene povezane z intrinzično odpornostjo, pri nekaterih sevih pa gene, ki se prenašajo z MGE, med njimi gene za karbapenemaze (16 % sevov) ter gene, ki kodirajo nekatere AME (*angl.*: aminoglycoside modifying enzymes). Pri vseh teh sevih smo našli tudi gene povezane s spremembami giraze (33 % sevov).

Od genov, ki nosijo zapise za karbapenemaze, smo našli izključno gene za MBL tipa VIM, prisotni so bili pri 6 pulzotipih oz. 3 ST, tako pri kliničnih (6,5 % sevov), kot tudi okoljskih sevih (27 % sevov). Večji delež večkratno odpornih sevov med okoljskimi vzorci bi lahko bil posledica selektivnih dejavnikov, ki se prenašajo skupaj z genskimi zapisi za MBL, kot so npr. geni, ki posredujejo odpornost proti težkim kovinam (192). Potrdili smo gene za dva podtipa karbapenemaz VIM: VIM-1 (dva seva, oba ST 253, en sev iz bolnišnice, en sev iz čistilne naprave) in VIM-2 (16 sevov, večina sevov (13) je izvirala iz čistilnih naprav, uvrščeni so bili v 3 ST: 111, 235, 654; le 3 sevi so izvirali iz bolnišnic, vsi trije ST 111). VIM-2 velja za najbolj razširjeno MBL pri *P. aeruginosa*, in je prevladovala tudi med našimi sevi. ST pri katerih smo potrdili MBL se v literaturi pogosto povezujejo z večkratno odpornimi sevi, pri nas smo jih našli tako med kliničnimi, še pogosteje pa med okoljskimi sevi.

Med geni za AME smo našli gen za kromosomalno fosfotransferazo, ki posreduje odpornost proti aminoglikozidom pri vseh analiziranih sevih (intrinzična odpornost). Druge gene, ki kodirajo AME in so povezani z MGE smo našli samo pri nekaterih sevih in določenih ST. Pri določenem sevu je lahko bilo prisotnih več encimov. Skupno število sevov pri katerih smo ugotovili genske zapise za AME, ki se prenašajo z MGE je bilo 25 (11 kliničnih in 14 okoljskih sevov). Ti geni so praviloma prisotni na MGE, običajno jih dokažejo v integronih, ki so povezani z večkratno odpornostjo. Tudi pri nas smo jih potrdili pri večkratno odpornih sevih. Našli smo jih tudi pri sevih, ki nosijo zapise za MBL (ST111, ST235, ST654), kar je pričakovano, saj se tudi ta prenaša z integroni.

Na primeru sedmih ST, ki so se pojavljali tako v bolnišnici kot tudi v okolju, smo ugotovili, da sama prisotnost genskega zapisa za določen mehanizem odpornosti ni nujno povezana z fenotipsko izraženo odpornostjo. Zlasti to velja za gene, ki so povezani z intrinzično odpornostjo. Bolj premočrna je povezava med prisotnostjo genov in odpornostjo pri tistih genih, ki se prenašajo z MGE, kjer smo dobro ujemanje ugotovili zlasti v primeru prisotnosti genov za karbapenemaze tipa VIM. Prisotnost teh genov je vedno povezana s fenotipično odpornostjo proti karbapenemom in drugim betalaktamom. Vsi sevi pri katerih smo dokazali gene za VIM so bili odporni proti predstavnikom vseh testiranih razredov protimikrobnih zdravil. Pri njih pa smo našli tudi gene za AME, ki se prenašajo z MGE. Sklepamo lahko, da gre v teh primerih za determinante odpornosti, ki se prenašajo skupaj znotraj integrona (2, 193, 194, 195). Pri vseh teh sevih smo našli tudi mutacije v girazi. Značilno je pojavljanje teh sevov pri ST111 in ST235, ki sodita med visoko rizične globalno razširjene seve *P. aeruginosa* (201).

Pri 112 sevih pri katerih smo analizirali celotni genom smo s pomočjo spletnega orodja My DataBase Finder ugotavljali tudi nekatere gene za virulencne dejavnike. Večina genskih zapisov za izbrane virulencne dejavnike je bila prisotna pri vseh sevih *P. aeruginosa*, kot to opisujejo tudi drugi avtorji. Stopnja in način izražanja teh genov se razlikuje glede na vplive okolja (21, 209). Enakomerna prevalenca genov, ki smo jih potrdili pri vseh analiziranih sevih, je skladna z ugotovitvijo, da je večina genov za virulenco pri *P. aeruginosa* umeščena v osrednji genom bakterije in jih zato najdemo pri vseh sevih, ne glede na njihov izvor (210, 218) Bolj neenakomerno zastopani so bili geni za sekrecijske sisteme tipa III povezani z izločanjem eksotoksinov Y, U, T in S. Vse skupine teh genov najdemo tako pri bolnišničnih kot okoljskih sevih. Geni povezani s sekrecijskim sistemom za izločanje eksotoksina Y in T so navzoči pri vseh sekvenčnih tipih (vendar ne pri vseh sevih), medtem ko so geni povezani s sekrecijskim sistemom za izločanje eksotoksina U in S povezani le z manjšim številom ST (14 oz. 36). V primerjavi z ostalimi skupinami genov kaže, da so se geni povezani s sekrecijskim sistemom tipa III za izločanje eksotoksina S in eksotoksina U relativno pogosteje pojavljali med kliničnimi sevi, geni povezani s sekrecijskim sistemom tipa III za izločanje eksotoksina T pa med okoljskimi sevi. Višji delež genov za eksotoksin S in U med kliničnimi sevi bi lahko bil skladen s funkcijo teh genov pri kolonizaciji, invazivnosti in razsoju okužbe. Pri teh dveh skupinah genov je tudi najmanj izraženo prekrivanje sekvenčnih tipov.

8. LITERATURA

1. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013; 67: 159-73.
2. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* 2018;7:212527. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.drugsincontext.com/how-to-manage-pseudomonas-aeruginosa-infections/>
3. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19: 419-26.
4. Mensa J, Barberan J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Canton R, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter* 2018; 31:78-100.
5. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 306-13.
6. Bedard E, Prevost M, Deziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen* 2016; 5: 937-56.
7. Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009; 30: 25-33.
8. Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, et al. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2222-8.
9. Muscarella LF. Contribution of tap water and environmental surfaces to nosocomial transmission of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25: 342-5.
10. Jovcic B, Vasiljevic Z, Djukic S, et al. Emergence of VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a paediatric hospital in Serbia. *J Med Microbiol*. 2011; 60: 868-9.
11. Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B, et al. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 57: 158-67.
12. Schwartz T, Armant O, Bretschneider N, Hahn A, Kirchen S, Seifert M, et al. Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-

- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microb Biotechnol* 2015; 8: 116-30.
13. Kelsey M. *Pseudomonas* in augmented care: should we worry? *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2697-700.
 14. Baron EJ. Rapid identification of bacteria and yeast: summary of a National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed guideline. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 220-5.
 15. Moore E., Tindall, B., Santos et al. *Nonmedical Pseudomonas*, In *The Prokaryotes*. (pp. 646-703). New York: Springer, 2006
 16. He J, Baldini RL, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2530-5.
 17. Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, Schomburg D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol* 2010; 12: 1734-47.
 18. Aujoulat F, Roger F, Bourdier A, Lotthe A, Lamy B, Marchandin H, et al. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes* 2012; 3: 191-232.
 19. Cuttelod M, Senn L, Terletskiy V, Nahimana I, Petignat C, Eggimann P, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1998-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 57-62.
 20. Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, Riu M, et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *BMC Health Serv Res* 2012; 12: 122. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/1472-6963-12-122>
 21. Klockgether J, Tummler B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res* 2017; 6: 1261. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://f1000research.com/articles/6-1261/v1>
 22. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 39. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310132/>
 23. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Medicine* 2016; 2: 25-32.

24. Jefferies JM, Cooper T, Yam T, Clarke SC. *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in the neonatal intensive care unit--a systematic review of risk factors and environmental sources. *J Med Microbiol* 2012; 61: 1052-61.
25. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 68-74.
26. Lodise TP, Jr., Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3510-5.
27. Kollef MH. Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin Infect Dis* 2008; 47 Suppl 1: S3-13.
28. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 560-78.
29. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67: 351-68.
30. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-40.
31. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia* 2012; 16:303-7.
32. El Amin N, Giske CG, Jalal S, et. al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*. 2005; 113: 187-96.
33. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006; 43 Suppl 2: 49-56.
34. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489-95.
35. Tsakris A, Poulou A, Kristo I, et al. Large dissemination of VIM-2-metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3524-9
36. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin microbiol rev*. 2005; 18: 306-25.
37. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis*

- 2013; 13: 505. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-505>
38. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin microbiol rev.* 2007; 20: 440-58.
 39. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47: 81-97.
 40. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 582-610.
 41. Moore NM, Flaws ML. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Lab Sci* 2011; 24: 47-51.
 42. Štrumbelj I, Berce I, Čretnik - Žohar T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike - Slovenija 2014. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2015. 1. izdaja. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>
 43. Štrumbelj I, Pirš M, Berce I, e tal. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija, 2016. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2018. 1. izdaja. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>
 44. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/anti-microbial-resistance-europe-2014.pdf>
 45. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>
 46. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, Francois B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care.* 2014;18:R17. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/cc13697>
 47. Schmidt J, Musken M, Becker T, Magnowska Z, Bertinetti D, Moller S, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PloS one.* 2011; 6: e18184. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018184>

48. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAOJ. *Bacteriol* 2001; 183: 6454-65.
49. Bianchi SM, Prince LR, McPhillips K, Allen L, Marriott HM, Taylor GW, et al. Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 35-43.
50. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(1):46-65.
51. Saier MH, Jr. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 2006; 214: 75-90.
52. Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 2009; 9 Suppl 1:S2. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654662/>
53. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 654-65.
54. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13: 831-42.
55. Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 2003; 71: 2404-13.
56. Lee VT, Smith RS, Tummeler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 2005; 73: 1695-705
57. Soong G, Parker D, Magargee M, Prince AS. The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J Bacteriol* 2008; 190: 2814-21.
58. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* 2005; 73: 1706-13.
59. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* 2012; 188: 386-93.
60. Rust L, Pesci EC, Iglewski BH. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (lasB) regulatory region. *J Bacteriol* 1996; 178: 1134-40.
61. Cathcart GR, Quinn D, Greer B, Harriott P, Lynas JF, Gilmore BF, et al. Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential

- therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2670-8.
62. Traidej M, Caballero AR, Marquart ME, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 190-6.
 63. Krueger KM, Barbieri JT. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 34-47.
 64. Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR. A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J* 2006; 273: 4579-93.
 65. Istivan TS, Coloe PJ. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* 2006; 152: 1263-74.
 66. Dubouix A, Nieto M, Fauvel J, Chap H, Marty N, Salles JP, et al. A simple and reliable method for rapid production and purification of *Pseudomonas aeruginosa* haemolytic phospholipase C. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38: 191-6.
 67. Mims CA, Nash A, Stephen J. *Mims pathogenesis of infectious diseases*. London: Academic Press; 2001. p. 231-232.
 68. Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Camara M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 247-74.
 69. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. *J Lab Physicians* 2011; 3: 4-11.
 70. Lieleg O, Caldara M, Baumgartel R, Ribbeck K. Mechanical robustness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Soft Matter* 2011; 7: 3307-14.
 71. Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future microbiology*. 2012 9: 1061-72.
 72. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 413-33.
 73. Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 2004; 35: 251-7.
 74. de Abreu PM, Farias PG, Paiva GS, Almeida AM, Morais PV. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol* 2014; 14: 118.
 75. Walker J, Moore G. *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *J Hosp Infect* 2015; 89: 324-7.
 76. Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open* 2014; 4: e006278. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006278>

77. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005; 33(5 Suppl 1):S41-9.
78. Naze F, Jouen E, Randriamahazo RT, Simac C, Laurent P, Bleriot A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3146-52.
79. Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2009; 201: 71-115.
80. Pirš M, Cerar T, Logar M, et al. Karbapenemaze pri *Acinetobacter baumannii* - izbruh v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana in prenosu v duge bolnišnice. *Med Razgl.* 2013; 52 Suppl 6: 149–59.
81. Golle A, Janežič S, Rupnik M, et al. Pojav in vrste karbapenemaz pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* v Mariborski regiji. *Med Razgl.* 2013; 52 Suppl 6: 129–38.
82. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
83. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 Suppl 3: 1-46.
84. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426-39.
85. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 2013; 18:20380. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.18.04.20380-en>
86. Ballarini A, Scalet G, Kos M, Cramer N, Wiehlmann L, Jousson O. Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BMC Microbiol* 2012; 12: 152. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-152>
87. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews.* 2009; 33: 892-916.
88. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2007;2(3):677-84.

89. Morales G, Wiehlmann L, Gudowius P, van Delden C, Tummler B, Martinez JL, et al. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* 2004; 186: 4228-37.
90. Lambiase A, Rossano F, Piazza O, Del Pezzo M, Catania MR, Tufano R. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with VAP in an intensive care unit. *New Microbiol* 2009; 32: 277-83.
91. Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, Rainey PB, Bell SC. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 263-8.
92. Sirmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1089-96.
93. Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, et al. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2766-73.
94. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 736-55.
95. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977; 74: 5463-7.
96. Wall JD, Tang LF, Zerbe B, Kvale MN, Kwok PY, Schaefer C, et al. Estimating genotype error rates from high-coverage next-generation sequence data. *Genome Res* 2014; 24: 1734-9.
97. Fox EJ, Reid-Bayliss KS, Emond MJ, Loeb LA. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl* 2014;1. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4331009/pdf/nihms-655291.pdf>
98. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 335-41.
99. van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1834-9.

100. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5644-9.
101. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999; 7: 482-7.
102. Maatallah M, Cheriaa J, Bakhrouf A, Iversen A, Grundmann H, Do T, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 2011; 6: e25617. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025617>
103. Maatallah M, Bakhrouf A, Habeeb MA, Turlej-Rogacka A, Iversen A, Pourcel C, et al. Four genotyping schemes for phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of their congruence with multi-locus sequence typing. *PLoS One* 2013; 8: e82069. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082069>
104. Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, Ledebner N, Weinstock GM. Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. *MBio* 2015; 6: e01888-15.
105. Leopold SR, Goering RV, Witten A, Harmsen D, Mellmann A. Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2365-70.
106. Kohl TA, Diel R, Harmsen D, Rothganger J, Walter KM, Merker M, et al. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2479-86.
107. Schurch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 350-54.
108. Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B, Bentzon MW, Hoiby N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34:202-4.
109. Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41: 4991-7.
110. Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8101-6.

111. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 2006; 7: R90. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>
112. Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 4110-5.
113. Ozer EA, Allen JP, Hauser AR. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics* 2014; 15: 737. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>
114. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-64.
115. Battle SE, Rello J, Hauser AR. Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 290: 70-8.
116. Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FS. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1):D646-53.
117. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tummler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol* 2011; 2: 150. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00150/full>
118. Spencer DH, Kas A, Smith EE, Raymond CK, Sims EH, Hastings M, et al. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2003; 185: 1316-25.
119. Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tummler B. Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol* 2011; 13: 1690-704.
120. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3100-5.
121. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 621-41.
122. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, Larbig KD, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* 2010; 192: 1113-21.

123. Cao H, Lai Y, Bougouffa S, Xu Z, Yan A. Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *BMC Genomics* 2017; 18: 459. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3842-z>
124. Aguilar-Barajas E, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Cervantes C. Heavy Metal Resistance in *Pseudomonads*. In: Ramos JL, Filloux A, editors. *Pseudomonas*. New York: Springer; 2010. pp. 255–282.
125. Shen K, Sayeed S, Antalis P, Gladitz J, Ahmed A, Dice B, et al. Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. *Infect Immun* 2006; 74: 5272-83.
126. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Valles J, Engel JN, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2002; 30: 521-8.
127. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* 2012; 40: 1157-63.
128. Reva ON, Tummler B. Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns. *BMC Bioinformatics* 2004; 5:90. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-90>
129. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol* 2016; 24: 327-37.
130. Marvig RL, Dolce D, Sommer LM, Petersen B, Ciofu O, Campana S, et al. Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* 2015; 15: 218. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0563-9>
131. van Mansfeld R, de Been M, Paganelli F, Yang L, Bonten M, Willems R. Within-Host Evolution of the Dutch High-Prevalent *Pseudomonas aeruginosa* Clone ST406 during Chronic Colonization of a Patient with Cystic Fibrosis. *PLoS One* 2016; 11: e0158106. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158106>
132. Sousa AM, Pereira MO. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathogens* 2014; 3: 680-703.
133. Reuter S, Harrison TG, Koser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open* 2013; 3. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002175>

134. Davis RJ, Jensen SO, Van Hal S, Espedido B, Gordon A, Farhat R, et al. Whole Genome Sequencing in Real-Time Investigation and Management of a *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak on a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36: 1058-64.
135. Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. *J Hosp Infect* 2018; 98: 282-88.
136. Turton JF, Wright L, Underwood A, Witney AA, Chan YT, Al-Shahib A, et al. High-Resolution Analysis by Whole-Genome Sequencing of an International Lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Metallo-Carbapenemases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2622-31.
137. Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, Topunov AF. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. *Hum Genomics* 2015; 9: 19. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0037-z>
138. Li J, Zou M, Dou Q, Hu Y, Wang H, Yan Q, et al. Characterization of clinical extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Hunan province of China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15: 35.
139. Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Freschi L, Levesque RC. Comparative genomics of a drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* panel and the challenges of antimicrobial resistance prediction from genomes. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364.
140. Dubern JF, Cigana C, De Simone M, Lazenby J, Juhas M, Schwager S, et al. Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. *Environ Microbiol* 2015; 17: 4379-93.
141. Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD, Charette SJ, et al. Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2014; 9:e87611. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087611>
142. Francis VI, Stevenson EC, Porter SL. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364.
143. Michael I, Rizzo L, McArdell CS, Manaia CM, Merlin C, Schwartz T, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res* 2013; 47: 957-95.
144. Pedro L, Banos RC, Aznar S, Madrid C, Balsalobre C, Juarez A. Antibiotics shaping bacterial genome: deletion of an IS91 flanked virulence determinant upon exposure to subinhibitory antibiotic concentrations. *PLoS One* 2011; 6: e27606. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027606>

145. Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front Microbiol* 2016; 7: 1728. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088501/>
146. Geisenberger O, Ammendola A, Christensen BB, Molin S, Schleifer KH, Eberl L. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174(1):9-17.
147. Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gutzkow T, Eichler W, et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 2009; 155: 2306-19.
148. Lood R, Erturk G, Mattiasson B. Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants - Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Front Microbiol* 2017; 8: 2298. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02298>
149. Lutz JK, Lee J. Prevalence of antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8: 554-64.
150. Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M, Elborn JS. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health* 2002; 5: 23-6.
151. Pirnay JP, Matthijs S, Colak H, Chablain P, Bilocq F, Van Eldere J, et al. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* 2005; 7: 969-80.
152. Schiavano GF, Carloni E, Andreoni F, Magi S, Chironna M, Brandi G, et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of *oprD* in imipenem resistant isolates. *PLoS One* 2017; 12: e0189172. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0189172>
153. Janežic S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol* 2010;646:55-65.
154. Romling U, Tummeler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 464-5.
155. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 866-75.
156. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2640-4.

157. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: D566-D73.
158. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3348-57.
159. McArthur AG, Wright GD. Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Curr Opin Microbiol* 2015; 27: 45-50.
160. Römling, U, Fiedler, B, Boßhammer, J et al. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1994; 170: 1616–1621
161. Golle A, Janežič S, Rupnik M. Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. *PLoS One* 2017; 12 : e0186736. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186736>
162. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37: 1288-301.
163. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34: 1-14.
164. Lynch JP, 3rd. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 2001; 119 (2 Suppl): 373S-84S.
165. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Mootsikapun P, Thamlikitkul V, Chomnawang MT. Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *P. aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 11: 25. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475077>
166. Woo TE, Lim R, Surette MG, Waddell B, Bowron JC, Somayaji R, et al. Epidemiology and natural history of *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *ERJ Open Res* 2018; 4(2). Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://openres.ersjournals.com/content/4/2/00162-2017>
167. Middleton MA, Layeghifard M, Klingel M, Stanojevic S, Yau YCW, Zlosnik JEA, et al. Epidemiology of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Canadian Cystic Fibrosis Population. *Ann Am Thorac Soc* 2018; 15: 827-36.

168. Telling K, Laht M, Brauer A, Remm M, Kisand V, Maimets M, et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 513. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3421-1>
169. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, et al. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 2012; 7: e49300. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049300>
170. Petit SM, Lavenir R, Colinon-Dupuich C, Boukerb AM, Cholley P, Bertrand X, et al. Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 2013; 164: 856-66.
171. Flores Ribeiro A, Bodilis J, Alonso L, Buquet S, Feuilloley M, Dupont JP, et al. Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *The Science of the total environment*. 2014; 490: 370-8.
172. Birosova L, Mackulak T, Bodik I, Ryba J, Skubak J, Grabic R. Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *The Science of the total environment*. 2014; 490: 440-4.
173. Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D, et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Front Microbiol* 2016; 7: 586. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853796/>
174. Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H, Marks GB, Wainwright CE, Bye PT, et al. Shared *Pseudomonas aeruginosa* genotypes are common in Australian cystic fibrosis centres. *Eur Respir J* 2013; 41:1091-100.
175. Martins VV, Pitondo-Silva A, Manco Lde M, Falcao JP, Freitas Sdos S, da Silveira WD, et al. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2014; 122: 92-100.
176. Martins VV, Zanetti MO, Pitondo-Silva A, Stehling EG. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014; 21: 5873-8.
177. Guzvinec M, Izdebski R, Butic I, Jelic M, Abram M, Koscak I, et al. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 6277-83.
178. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2578-83.
179. Moyo S, Haldorsen B, Aboud S, Blomberg B, Maselle SY, Sundsfjord A, et al. Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is

- associated with sequence types 244 and 640 and the location of blaVIM-2 in a TniC integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 682-5.
180. Garcia-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, et al. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2905-10.
 181. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6349-57.
 182. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza J W, Tapalski DV, Azizov IS, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 867-76.
 183. Oliver A. Clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa* hypermutation in cystic fibrosis chronic respiratory infection. *J Cyst Fibros* 2015; 14: e1-2.
 184. Lepsanovic Z, Libisch B, Tomanovic B, Nonkovic Z, Balogh B, Fuzi M. Characterisation of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008; 55: 447-54.
 185. Libisch B, Watine J, Balogh B, Gacs M, Muzslay M, Szabo G, et al. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol* 2008; 159: 162-8.
 186. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 2010; 161: 234-42.
 187. Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci Total Environ* 2012; 426: 366-74.
 188. Fuentefria DB, Ferreira AE, Graf T, Corcao G. *Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 470-3.
 189. Pappa O, Vantarakis A, Galanis A, Vantarakis G, Mavridou A. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 2016; 92: fiw086. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw042>
 190. Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernandez-Baca V, Pareja A, Pascual M, Diaz-Antolin P, et al. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol* 2013; 13: 138. Dostopno [citirano 2019

Feb 11] na <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-138>

191. Sardelic S, Pallecchi L, Punda-Polic V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1022-3.
192. Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol* 2012; 3: 399. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
193. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4062-70.
194. Cho HH, Kwon KC, Sung JY, Koo SH. Prevalence and genetic analysis of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a hospital in Korea, 2008-2012. *Ann Clin Lab Sci* 2013; 43: 414-9.
195. Perez F, Hujer AM, Marshall SH, Ray AJ, Rather PN, Suwantarant N, et al. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates containing blaVIM-2 and elements of Salmonella genomic island 2: a new genetic resistance determinant in Northeast Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5929-35.
196. Agnello M, Finkel SE, Wong-Beringer A. Fitness Cost of Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Differs by Type III Secretion Genotype. *Front Microbiol* 2016;7:1591.
197. Melnyk AH, Wong A, Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl* 2015; 8:273-83.
198. Cabot G, Zamorano L, Moya B, Juan C, Navas A, Blazquez J, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 1767-78.
199. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 489-93.
200. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1766-71.
201. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 5527-35.
202. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 131-43.

203. Kali A, Srirangaraj S, Kumar S, Divya HA, Kalyani A, Umadevi S. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Australas Med J* 2013; 6: 686-93.
204. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 479-87.
205. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011; 2: 65. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00065/full>
206. Kuhnert P, Boerlin P, Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 107-17.
207. Hilali F, Ruimy R, Saulnier P, Barnabe C, Lebouguenec C, Tibayrenc M, et al. Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect Immun* 2000;68(7):3983-9.
208. Russell CW, Fleming BA, Jost CA, Tran A, Stenquist AT, Wambaugh MA, et al. Context-Dependent Requirements for FimH and Other Canonical Virulence Factors in Gut Colonization by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2018; 86. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820936/>
209. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 1-20.
210. Morales-Espinosa R, Soberon-Chavez G, Delgado-Sapien G, Sandner-Miranda L, Mendez JL, Gonzalez-Valencia G, et al. Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS One* 2012; 7: e37459. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037459>
211. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pol J Microbiol* 2009; 58: 255-60.
212. Kaiser SJ, Mutters NT, DeRosa A, Ewers C, Frank U, Gunther F. Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36: 243-53.
213. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2001; 147: 2659-69.
214. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 2009; 4: e7740. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>

215. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care* 2014; 18: 668. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>
216. Khattab MA, Nour MS, ElSheshtawy NM (2015) Genetic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes among Different Isolates. *J Microb Biochem Technol* 7:274-277. doi:10.4172/1948-5948.1000224
217. Pena C, Cabot G, Gomez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 539-48.
218. Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8484-9.
219. Domitrovic TN, Hujer AM, Perez F, Marshall SH, Hujer KM, Woc-Colburn LE, et al. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Causing Prosthetic Valve Endocarditis: A Genetic-Based Chronicle of Evolving Antibiotic Resistance. *Open Forum Infect Dis* 2016; 3. Dostopno [citirano 2019 Feb 11] na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091635/pdf/ofw188.pdf>
220. Lee JY, Peck KR, Ko KS. Selective advantages of two major clones of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates (CC235 and CC641) from Korea: antimicrobial resistance, virulence and biofilm-forming activity. *J Med Microbiol* 2013; 62:1015-24.
221. Feng W, Sun F, Wang Q, Xiong W, Qiu X, Dai X, et al. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *J Glob Antimicrob Resist* 2017; 8: 142-47.

9. ČLANEK KOT DEL DOKTORSKE DISERTACIJE

Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants.

Izpis iz COBISS podatkovne baze:

GOLLE, Andrej, JANEŽIČ, Sandra, RUPNIK, Maja. Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. PloS one, ISSN 1932-6203, 2017, vol. 12, iss. 10, str. 1-13. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186736>, doi: 10.1371/journal.pone.0186736. [COBISS.SI-ID 512751672], [JCR, SNIP, WoS do 6. 12. 2017: št. citatov (TC): 0, čistih citatov (CI): 0, Scopus do 9. 12. 2017: št. citatov (TC): 0, čistih citatov (CI): 0]

IF: 2.766

10. PRILOGE

PRILOGA I

Razdelitev sevov *P. aeruginosa* glede na pulzotipe in tipe MLST ter njihov izvor

			Vir vzorca			
			Klinični vzorci		Okoljski vzorci	
Pulzotipi	Skupno število sekvenciranih izolatov	MLST tip	VEČJA UČNA BOLNIŠNICA	DRUGE ZDRAVSTVENE USTANOVE	ČISTILNA NAPRAVA A	ČISTILNA NAPRAVA B
Pt1	9	298	57			
Pt2	2	17	3			
Pt3	1	235	1			
Pt4	1	190			1	
Pt5	4	235	5			
Pt6	1	189			1	
Pt7	1	155	1			
Pt8	1	2605	1			
Pt9	1	968				2
Pt10	6	235 (5 genomov) 313 (1 genom)			15	3
Pt11	1	235			2	
Pt12	4	309	3		1	1
Pt13	1	245	1			
Pt14	2	253	1		1	
Pt15	1	313			2	
Pt16	4	313			6	3
Pt17	7	111	5	3	3	3
Pt18	2	654			4	
Pt19	2	244				4
Pt20	1	244			1	
Pt21	1	108	3			
Pt22	3	2416			3	1
Pt23	1	2588	1			
Pt25	1	17			1	
Pt26	2	381(1 genom) 27(1 genom)	2			
Pt27	1	235			1	
Pt28	1	2590			1	
Pt29	1	671			1	
Pt30	1	270	2			
Pt31	2	111	3			
Pt32	1	235			1	
Pt34	1	116	1			
Pt35	1	1027			2	

			Vir vzorca			
			Klinični vzorci		Okoljski vzorci	
Pulzotipi	Skupno število sekvenciranih izolatov	MLST tip	VEČJA UČNA BOLNIŠNICA	DRUGE ZDRAVSTVENE USTANOVE	ČISTILNA NAPRAVA A	ČISTILNA NAPRAVA B
Pt36	1	532	1			
Pt37	1	395	2			
Pt38	1	527			1	
Pt39	1	2589	1			
Pt40	1	2585				2
Pt41	1	2587	1			
Pt42	1	1403	1			
Pt43	1	155	1			
Pt44	1	2591	1			
Pt45	1	273			1	
Pt46	1	591				1
Pt47	4	313(1 genom) 654(3 genomi)			3	2
Pt48	1	110	1			
Pt49	1	2615			1	
Pt50	5	242	8			1
Pt52	1	242	1			
Pt53	1	226			1	
Pt54	2	27(1 genom) 298(1 genom)	2			
Pt56	1	298	1			
Pt57	1	2614			1	
Pt59	1	1405	1			
Pt60	1	244	1			
Pt61	1	1000			1	
Pt62	1	2604	2			
Pt63	2	508(1 genom) 274(1 genom)	1		1	
Pt64	1	1284			5	
Pt65	1	111			1	
Pt66	1	253	1			
Pt67	1	298	1			
Pt68	1	242	1			
Pt69	1	164	1			
Pt70	2	235(1 genom) 1129(1 genom)	2			
NT	1	2613	1			
Skupaj	112		123	5	61	22

Priloga III:

Proti karbapenemom odporni pulzotipi *P. aeruginosa*, ki smo jih osamili iz kliničnih kužnin, glede na mesec osamitve in lokacijo.

Pulzotip	Št. sevov	Mesec osamitve												Lokacija		
		I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	A	B	DL
Pt1	57	3	6	8	8	6	4		3	3		11	5	X		
Pt17	8		1			1	1			1		2	2	X	X	
Pt50	8			3	3			1			1			X		
Pt5	5									3	2			X		
Pt2	3					2						1		X		
Pt12	3				1		1						1	X		
Pt21	3			1							1	1		X		
Pt31	3											3		X		
Pt22	2			2										X		
Pt26	2				1		1							X		
Pt30	2											1	1	X		
Pt54	2		2											X		
Pt62	2							1			1			X		
Pt63	2		1							1				X		X
Pt3	2					1						1		X		
Pt7	1						1							X		
Pt8	1											1		X		
Pt13	1								1					X		
Pt14	1								1					X		
Pt23	1										1			X		
Pt34	1			1										X		
Pt36	1			1										X		
Pt37	1												1	X		
Pt39	1										1			X		
Pt41	1	1												X		
Pt42	1					1								X		
Pt43	1									1				X		
Pt44	1				1									X		
Pt48	1					1								X		
Pt52	1				1									X		
Pt56	1											1		X		
Pt59	1			1										X		
Pt60	1										1			X		
Pt66	1									1				X		
Pt65	1							1								X
Pt67	1								1					X		
Pt68	1										1			X		
Pt69	1											1		X		
Skupaj 38 pulzotipov	127	4	10	17	15	12	8	3	6	10	9	23	10			

Legenda: Pt = pulzotipi; Št. sevov = skupno število osamljenih sevov; A = večja učna bolnišnica; B = manjša regionalna bolnišnica; DL = druge zdravstvene lokacije; tipizirali smo 127 sevov v 31 pulzotipov.

Priloga IV.:

Proti karbapenemom odporni pulzotipi *P. aeruginosa*, ki smo jih osamili iz vode čistilnih naprav, glede na mesec osamitve in lokacijo.

Pulzotip	Št.	Mesec osamitve												Lokacija	
		I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	ČNA	ČNB
Pt10	18	0	0	1	1	4	2	6	1	0	0	1	2	X	X
Pt16	9	1				1			4			1	2	X	X
Pt47	5			1				1	2	1				X	X
Pt64	5				1	3	1							X	
Pt17	4			1			1	1		1				X	X
Pt18	4			1		1					1		1	X	
Pt19	4										4				X
Pt22	4			1		1	2							X	X
Pt11	2			2										X	
Pt12	2			1								1		X	X
Pt15	2										2			X	
Pt35	2			1							1			X	
Pt40	2										2				X
Pt4	1									1				X	
Pt6	1												1	X	
Pt9	1	1													X
Pt14	1										1			X	
Pt20	1											1		X	
Pt25	1						1							X	
Pt27	1						1							X	
Pt28	1						1							X	
Pt29	1			1										X	
Pt38	1						1							X	
Pt45	1											1		X	
PT46	1										1				X
Pt49	1									1				X	
Pt50	1					1									X
Pt53	1							1						X	
Pt57	1					1								X	
Pt61	1				1									X	
Pt32	1										1			X	
Skupaj 31 pulzotipov	81	2	0	10	3	12	10	9	7	4	13	5	6		

Legenda: Pt = pulzotipi; Št. sevov = skupno število osamljenih sevov; ČNA = večja čistilna naprava; ČNB = manjša čistilna naprava; tipizirali smo 81 sevov v 31 pulzotipov

11. DELOVNI ŽIVLJENJEPIS

Rodil sem se 5. septembra 1965 v Mariboru. Obiskoval sem osnovno šolo Slavko Šlander, nato pa sem se vpisal na gimnazijo Miloša Zidanška v Mariboru. Po končani gimnaziji sem se vpisal na Medicinsko Fakulteto Univerze v Ljubljani, Odsek za Medicino. Diplomiral sem 10. 02. 1994. Po končanem pripravništvu sem 28. 03. 1995 opravil strokovni izpit za poklic Zdravnik. 04. 06. 1996 sem opravil enosemestralni podiplomski študij Hospitalne higijene. Specialistični izpit iz klinične mikrobiologije sem opravil 22. 12. 2000.

Od leta 1994 sem zaposlen v Centru za mikrobiologijo ZZV Maribor, ki se je z reorganizacijo ZZV preimenoval v Center za medicinsko mikrobiologijo (CMM) in deluje v sklopu Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Trenutno vodim Center za medicinsko mikrobiologijo na lokaciji Maribor.

Tekom svoje poklicne poti sem se ukvarjal z diagnostiko bakterijskih in glivnih okužb ter s klinično molekularno diagnostiko.

V laboratorij sem uvedel nove diagnostične postopke in metode kot so: testirane občutljivosti kvasovk z metodo Etest, diagnostika izolatov nitastih gliv z metodo mikrokulture, potrjevanje izoliranih sevov MRSA z PCR metodo, diagnostiko okužb z verižno reakcijo s polimerazo na *C. trachomatis*, Noroviruse in atipične bakterijske povzročitelje okužb dihal. Aktivno sem sodeloval pri vpeljavi molekularnih metod za detekcijo gensko spremenjenih organizmov v hrani. Še vedno aktivno sodelujem pri vpeljavi novih diagnostičnih metod v mikrobiološki laboratorij.

Sodelujem pri pripravi navodil za delo in pri postopkih, ki so potrebni za verifikacijo laboratorija.

V sodelovanju z Ministrstvom za zdravje sem izvajal presoje kliničnih mikrobioloških laboratorijev po Pravilniku o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji na področju laboratorijske medicine

Vodim Komisijo za bolnišnične okužbe pri PB Ormož in sem član KOBO pri UKC Maribor in SB Ptuj.

Aktivno sodelujem pri izobraževalnem procesu na Medicinski fakulteti Maribor.

Ob delu sem vpisal Interfakultetni magistrski študij Mikrobiologije. Leta 2013 sem zaključil magistrsko nalogo Uporabnost metode kvantitativnega PCR pri dokazovanju okužb z bakterijo

Chlamydia trachomatis (mentorica doc. dr. Darje Keše, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani).

Redno se izobražujem in sodelujem na strokovnih srečanjih.

Sem član Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe pri SZD, kjer sem tudi član UO in član Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ). Sem član ESCMID (Evropsko združenje za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni).

Vodil sem organizacijo srečanj Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe pri SZD, ki je potekalo leta 2006 in 2014 (Okužbe v nosečnosti in obporodnem obdobju in Okužbe spolovil in spolno prenosljive bolezni).

12. ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Maji Rupnik, ki me je z veliko mero potrpežljivosti usmerjala pri načrtovanju raziskave in izdelavi doktorske naloge. Njena doslednost, natančnost in optimizem, ter bogate izkušnje pri raziskovalnem delu so mi bile v veliko pomoč pri izpeljavi moje naloge.

Posebej se zahvaljujem osebju Centra za medicinsko mikrobiologijo NLZOH Maribor, ki so mi pomagali pri zbiranju kliničnih sevov in pri nekaterih laboratorijskih postopkih. Iskrena hvala tudi kolegoma Dušanu Novaku in Slavici Lorenčič Robnik za njuno vsestransko vzpodbudo ob mojem delu.

Zahvaljujem se tudi osebju Centra za okolje in zdravje pri NLZOH in zaposlenim v laboratorijih Centralne čistilne naprave Maribor in Centralne čistilne naprave Ptuj za pomoč pri pridobivanju in zbiranju okoljskih vzorcev.

Iskreno se zahvaljujem tudi asist. dr. Sandri Janežič in Tanji Vrabič ter ostalim sodelavcem na Oddelku za mikrobiološke raziskave in razvoj, ki so mi pomagali pri izvajanju metode PFGE in opravili sekvenciranje sevov, ki sem jih preučeval v nalogi.

Ob koncu se zahvalim še družini in vsem prijateljem, ki so mi ob izvajanju naloge potrpežljivo stali ob strani in me vzpodbujali pri delu.

Brez znanja, pomoči in potrpežljivosti vseh omenjenih naloge ne bi mogel opraviti.

13. IZJAVA

PRILOGA 4: IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

UNIVERZA V MARIBORU MEDICINSKA FAKULTETA

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime in priimek študenta: Andrej Golle

Študijski program: Biomedicinska tehnologija

Naslov doktorske disertacije: MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PROTI KARBAPENEMOM ODPORNIH SEVOV BAKTERIJE PSEUDOMONAS AERUGINOSA IZ KUŽNIN IN OKOLJA

Mentorica: prof. dr. Maja Rupnik

Podpisani študent: Andrej Golle izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega znanstvenoraziskovalnega dela;

- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM in drugih informacijskih zbirk in ponudnikov; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-D, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM;
- Izjavljam, da sem seznanjen s pogoji Proquest-a za oddajo in javno objavo doktorske disertacije v podatkovno zbirko ProQuest Dissertations & Theses Global (<http://contentz.mkt5049.com/lp/43888/382619/PQDTauthoragreement.pdf>).

Začasna nedostopnost:

Zaključno delo zaradi zagotavljanja konkurenčne prednosti, zaščite poslovnih skrivnosti, varnosti ljudi in narave, varstva industrijske lastnine ali tajnosti podatkov naročnika: _____ (naziv in naslov naročnika/institucije) ne sme biti javno dostopno do _____ (datum odloga javne objave ne sme biti daljši od 3 let od zagovora dela). To se nanaša na tiskano in elektronsko obliko zaključnega dela.

Temporary unavailability:

To ensure competitive advantage, protection of business secrets, safety of persons and nature, protection of industrial property, or confidentiality of information of the client _____ (client/institution name and address)) the thesis shall not be accessible to the public until _____ (the deferment of public availability shall not exceed 3 years from the date of the thesis defense). This applies to printed and electronic thesis forms.

Maribor, julij 2019

Podpis študenta: