

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ARSTITEADUSKOND  
MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Kristiine Pai

**Balti regioonis kliinilistest materjalidest isoleeritud *Escherichia coli* tüvede laiendatud toimega beeta-laktamaaside produktsiooni fenotüübiline ja genotüübiline iseloomustus**  
Magistritöö

Juhendajad vanemteadur Epp Sepp, MD, PhD, teadur Siiri Kõljalg, MD, PhD  
Kaasjuhendaja vanemteadur Andres Mäe, PhD

TARTU 2014

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. <i>Escherichia coli</i> iseloomustus .....	6
1.1.1. Infektsioone põhjustav patogeenne <i>E. coli</i> .....	6
1.1.1.1 Soolevälised infektsioonid.....	7
1.1.1.2 Soolesised infektsioonid.....	7
1.1.2. <i>E. coli</i> fülogeneetiline kuuluvus .....	8
1.2. Antibiootikumid .....	9
1.2.1. Beeta-laktaam antibiootikumid .....	9
1.2.2. Resistentsuse mehhanismid beeta-laktaam antibiootikumidele.....	10
1.2.3. Beeta-laktamaasi määravate geenide evolutsioon .....	10
1.2.4. Beeta-laktamaaside klassifikatsioon.....	12
1.2.4.1. Ambleri skeem .....	13
1.2.4.2. Bush-Jacoby-Mederos süsteem .....	13
1.2.4.3. Giske klassifikatsioon.....	14
1.3. Laiendatud beeta-laktamaasi määravate geenide epidemioloogia.....	15
1.3.1. Beeta-laktamaasi produtseerivate <i>E. coli</i> tüvede reservuaarid ja ülekannet.....	15
1.3.1.1. Beeta-laktamaasi produtseerivate <i>E. coli</i> tüvede ESBL geenide ülekannet .....	16
1.3.1.2. <i>E. coli</i> klonaalne levik ( <i>Sequence Type</i> 131 O25:H4).....	17
1.3.3. Levik Euroopas.....	17
1.3.3.1. Levik Ida-Euroopas ja Baltimaades.....	19
1.4. Laiendatud beeta-laktamaaside määramine.....	19
1.4.1. Fenotüübilised meetodid .....	19
1.4.2. Genotüübilised meetodid.....	20
2. Eksperimentaalosa.....	21
2.1. Töö eesmärgid .....	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. <i>E. coli</i> identifitseerimine .....	21

2.2.2. ESBL fenotüübi määramine .....	21
2.2.2.1. ESBL <sub>A</sub> , ESBL <sub>M</sub> .....	21
2.2.3. Genotüübiline ESBL määramine.....	22
2.2.3.1. DNA eraldamine.....	22
2.2.3.2. ESBL <sub>A</sub> bla <sub>SHV</sub> geeni identifitseerimine PCR meetodil .....	22
2.2.3.3. ESBL <sub>A</sub> CTX-M klastrite määramine real-time PCR meetodi abil.....	23
2.2.3.4. <i>E. coli</i> fülogeneetilise grupi määramine .....	24
2.2.3.5. <i>E. coli</i> klooni ST131 O25:H4 identifitseerimine PCR <i>pabB</i> meetod .....	25
2.2.3.6. Statistiline analüüs.....	25
2.3. Tulemused .....	26
2.3.1. Kliinilistest materjalidest isoleeritud <i>E. coli</i> tüvede ESBL fenotüübid ja genotüübid .....	26
2.3.1.1. <i>E. coli</i> jaotus ESBL fenotüübi järgi.....	26
2.3.1.2. <i>E. coli</i> tüvedel ESBL <sub>A</sub> geenide jaotus.....	26
2.3.1.3. ESBL: genotüübiline ja fenotüübiline võrdlus .....	27
2.3.1.4. <i>E. coli</i> fülogeneetiline kuuluvus ja seos ESBL <sub>A</sub> geenidega.....	28
2.3.1.5. <i>E. coli</i> kloon ST131-O25:H4 esinemissagedus ja seos ESBL <sub>A</sub> geenidega.....	29
2.3.2. ESBL <sub>A</sub> epidemioloogia .....	30
2.3.2.1. Erinevatest riikidest isoleeritud <i>E. coli</i> tüvede ESBL <sub>A</sub> geenide jaotus.....	30
2.3.2.2. Erinevatest riikidest isoleeritud tüvede seas <i>E. coli</i> klooni ST131-O25:H4 esinemissagedus .....	30
2.4. Arutelu.....	32
Kokkuvõte .....	37
Summary .....	38
Kasutatud kirjandus:.....	39
Tänuavaldused.....	49
Lihtlitsents .....	50

## Kasutatud lühendid

CAZ– tseftasidiim

CAZ-C– tseftasidiim + klavulaanhape

CAZ-CX– tseftasidiim + kloksatsilliin

CLSI– Kliiniliste ja Laboratoorsete Standardite Instituut (ingl k., *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CTX– tsefotaksiim

CTX-C– tsefotaksiim + klavulaanhape

CTX-CC– tsefotaksiim + kloksatsilliin

*E. coli*– *Escherichia coli*

EAEC– enteroagregatiivne *E. coli* (ing k., *enteroaggregative E. coli*)

EARS-Net–n üleeuroopaline ravimiresistentsus jälgimissüsteem (ing k., *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*)

EDTA– raskemetalli kelaatori (ing k., *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EHEC– enterohemorraagiline *E. coli* (ing k., *enterohemorrhagic E. coli*)

EIEC– enteroinvasiivne *E. coli* (ing k., *enteroinvasive E. coli*)

EPEC– enteropatogeenne *E. coli* (ing k., *enteropathogenic E. coli*)

ESBL– laiendatud-toimespektriga beeta-laktamaas (ing k., *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*)

ETEC– enterotoksigeenne *E. coli* (ing k., *enteroaggregative E. coli*)

EUCAST– Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Euroopa Komitee (ing k., *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

ExPEC– sooleväline patogeene *E. coli* (ing k., *extraintestinal pathogenic E. coli*)

IPEC– soolesisene patogeene *E. coli* (ing k., *intestinal pathogenic E.coli*)

KPC– *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaasid (ing k., *K. pneumoniae carbapenemase*)

MALDI-TOF MS– maatriksaine vahendatud laseril põhinev desorptsioon-ionisatsioon lennuaja mass-spektromeetria (ing k., *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*)

MBL– metallo-beeta-laktamaasid

MDR– multi-resistentne patogeen (ing k., *multidrug resistant pathogen*)

MIK– minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

MLST– multilookus järjestuse tüpiseerimine (ing k., *multilocus sequence typing*)

PAI– patogeensuse saared (ing k., *pathogenicity islands*)

PBP– penitsilliini siduv valk (ing k., *penicillin binding protein*)

ST– nukleiinhappe järjestuse tüüp (ing k., *sequence type*)

UPEC– uropatogeene *E. coli* (ing k., *uropathogenic E. coli*)

## Sissejuhatus

*Escherichia coli* (*E. coli*) on Gram-negatiivne pulkbakter. See on inimestel ja teistel imetajatel kõige sagedamini mikroflooras leiduv mikroob. Tüved võivad olla kommensaalsed ning eksisteerida normaalse mikrofloora osana või põhjustada erinevaid infektsioone (uuroinfektsioone, sepsist, meningiiti) (Schaechter, 2009). *E. coli* infektsioonide raviks kasutatakse sagedasti  $\beta$ -laktaam antibiootikume, mis on bakteritsiidse toimega ained takistades mikroobil rakuseina sünteesi. Selle vastu võitlemiseks on mikroobidel mitmeid erinevaid mehhanisme. Üheks olulisemaks on ensüümi  $\beta$ -laktamaasi produktsioon, mis lõhub antibiootikumi  $\beta$ -laktaam ringi. Viimasel kümnendil on bakterite resistentsus seotud laiendatud-toimespektriga  $\beta$ -laktamaaside produktsiooniga (ing k., *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*, ESBL).

ESBL-id on ensüümide grupp, mis on võimelised inaktiveerima ja põhjustama seeläbi resistentsust oksüimino-tsefalosporiinide (3. ja 4. põlvkonna tsefalosporiinid) ja monobaktaamide (astreonaam) vastu, aga mitte tsefamütsiinide või karbapeneemide vastu (Bush & Jacoby, 2010). Laiendatud toimespektriga  $\beta$ -laktamaase produtseerivaid tüvesid klassifitseeritakse Bush-Jacoby-Mederos funktsionaalse süsteemi järgi gruppi 2be, Ambleri klassidesse A ja D ning Giske *et al.* järgi klassi ESBL<sub>A</sub> (Ambler *et al.* 1991; Giske *et al.*, 2009; Bush & Jacoby, 2010). Klassi ESBL<sub>A</sub> kuuluvaid ESBL-e saab jagada kolme gruppi: SHV, TEM ja CTX-M (Giske *et al.*, 2009). Käesoleva aasta alguseks oli CTX-M-i variante detekteeritud ligi 150, SHV-sid ligi 180 ja TEM-tüüpi ensüüme 200 ringis (<http://www.lahey.org/studies/>).

ESBL tüvede globaalset levikut on seostatud erinevate geneetiliste elementidega (plasmiidid, intergronid) ning tüvede kлонаalse päritoluga ja nende fülogeneetilise kuuluvusega (Markovska *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013; Onnberg *et al.*, 2011). Laiendatud toimespektriga  $\beta$ -laktamaase produtseerivate bakterite poolt põhjustatud infektsioonide ravi on problemaatiline, sest need ei allu enamikele  $\beta$ -laktaam antibiootikumidele, jättes võimalikuks antimikroobse ravi variandiks karbapeneemid ja tsefamütsiinid. Resistentsete tüvede levik maailmas on erinev. Eesti kliinilistest tüvedest isoleeritud *E. coli* ja *Klebsiella pneumoniae* fenotüübiline resistentsus on kõrge, olles sarnane Kesk- ja Lõuna Euroopale (ECDC, 2013). Maailmas on põhjalikult uuritud  $\beta$ -laktamaasi produtseerivate bakteritüvede levikut. Kirjanduse andmetel on Euroopas enim levinud CTX-M-1 ja CTX-M-9 geeni klastritesse kuuluvad geenid ning *bla*<sub>SHV</sub> ja *bla*<sub>TEM</sub> erinevad variandid on viimasel kümnendil tahaplaanile jäänud (Starlander *et al.*, 2014; Gibold *et al.*, 2014). Andmed ESBL positiivsete tüvede leviku kohta Balti mere piirkonna riikides ja Venemaal (Peterburg) on kesised.

Käesoleva töö eesmärgiks on kirjeldada Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburg) kliinilistest materjalidest isoleeritud  $\beta$ -laktamaase produtseerivate *E. coli* tüvede fenotüübilist ja genotüübilist jaotust, ESBL<sub>A</sub> geene (CTX-M, *bla*<sub>SHV</sub>) ning nende seost fülogeneetilise ja kлонаalse kuuluvusega ning piirkonna epidemioloogiat. Töö koosneb teemakohase kirjanduse ülevaatest ja eksperimentaalsast. Eksperimentaalsast teostati Tartu Ülikooli arstiteaduskonna mikrobioloogia instituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Escherichia coli* iseloomustus

Perekonda *Escherichia* kuulub 7 liiki: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. albertii*. Tüüpiliigiks on *E. coli* ehk soolekepike. See on Gram-negatiivne pulgakujuline bakter, mis kuulub inimese normaalsesse mikroobiootasse persisterides peamiselt seedetraktis käärsoole limaskestal (Schaechter, 2009; Madigan *et al.*, 2011).

*E. coli* moodustab mitmekesise bakterite populatsiooni. Selle genoomi suurus jääb vahemikku 4,5-5,6 Mb ning seejuures ligi 30% DNA-st võib olla tüve-spetsiifiline (Dobrindt, *et al.*, 2010). Tänu dünaamilisele genoomile ja geneetilisele mitmekesisusele kasutab *E. coli* energiaks mitmeid süsinikuallikaid ning on võimeline elama erinevates keskkondades. *E. coli* on fakultatiivne aeroob, mistõttu suudab elada nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes (Schaechter, 2009; Monk *et al.*, 2013).

*E. coli* kommensaalsed tüved on kohastunud kooseluks peremeesorganismiga ning ei tekita infektsioone (Maltby *et al.*, 2013). Inimese esimene kokkupuude *E. coli* ga toimub sünnihetkel, kui mikroobid kanduvad ema fekaalsest ja vaginaalsest mikroobiootast lapsele (Madigan *et al.*, 2011). Kommensaalse *E. coli* hulk seedetraktis on väike, kuid on vajalik, et kaitsta patogeensete tüvede kolonisatsiooni eest (Madigan *et al.*, 2011). *E. coli* on oluline anoksilise keskkonna säilitamiseks, tarbides sooles leiduvat hapniku. Lisaks sünteesib *E. coli* K-vitamiini, mis on oluline inimese normaalseks vere koagulatsiooniks ja kaltsiumi tasakaalu reguleerimiseks (Madigan *et al.*, 2011; Card *et al.*, 2013).

### 1.1.1. Infektsioone põhjustav patogeenne *E. coli*

*E. coli* on oportunistlik mikroob ning ohutute kommensaalsete tüvede kõrval leidub selliseid, mis võivad põhjustada erinevaid infektsioone (Madigan *et al.*, 2011). Need *E. coli* tüved kannavad mitmeid virulentsusfaktoreid kodeerivaid gene, mis on olulised peremeesorganismi koloniseerimiseks, kudedesse tungimiseks ja infektsiooni tekitamiseks. Nende hulka kuuluvad polüsahhariidse kapsli, adhesiinide, toksiinide, invasiinide ja siderofooride geenid, mille ekspresseerumine on vajalik peremeesorganismi kaitsemehhanismidega võitlemiseks (Schaechter, 2009). Seejuures on virulentsusgeenid olemas ka kommensaalsetes tüvedes, kuid vähem kui patogeensetes *E. coli* des (Duriz *et al.*, 2001). Virulentsus on bakteri jaoks oluline omadus, et jääda ellu peremeesorganismis, kuid see ei ole püsiv omadus ning võib horisontaalse geeniülekanne tõttu teatud aja järel kaduda või olla omandatav (Le Gall *et al.*, 2007).

Patogeenne *E. coli* võib põhjustada mono- ja segainfektsioone (Schaechter, 2009). Nakkust põhjustavad tüved jaotatakse vastavalt infektsiooni lokaliseerimisele fakultatiivsetelts soolevälisteks patogeenseteks (ingl k., *extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) ja soolesisesteks patogeenseks (ing k., *intestinal pathogenic E. coli*, IPEC) *E. coli* deks (Köhler & Dobrindt, 2011).

Kirjanduse andmetel võivad nii ExPEC kui ka IPEC tüved seedetrakti püsivalt koloniseerida, põhjustamata haigussümptomeid (De Moura *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2014). IPEC tüved erinevad ExPEC ja mitte-patogeensetest tüvedest nii epidemioloogia kui evolutsioonilise päritolu poolest. ExPEC tüvedel ja kommensaalsetel *E. coli* del on väga sarnane genoom ning selle tõttu on ka molekulaarsete meetodite abil raske patogeenseid tüvesid kommensaalsetest *E. coli* dest eristada (Köhler & Dobrindt, 2011).

#### **1.1.1.1 Soolevälised infektsioonid**

Sooleväliseid infektsioone tekitav *E. coli* (ExPEC) tüved võivad põhjustada erinevaid infektsioone levides soolestikust teistesse keha piirkondadesse. *E. coli* patogeensed tüved põhjustavad kõige sagedamini kuseteede-, pehmete kudede ja kesknärvisüsteemi infektsioone (Johnson & Stell, 2000; Hussain *et al.*, 2012; Maltby *et al.*, 2013). Kirjanduse andmetel omavad ExPEC tüved sagedamini erinevaid adhesiini, fimbria ja kapsli geene, mis võimaldavad paremat kinnitumist ja rakku tungimist (Vollmerhausen & Katouli, 2014).

Kuseteede infektsioonidest põhjustavad ExPEC tüved kõige sagedamini tsüstiiti ja püelonefriiti. Need on erineva sümptomaatika ja raskusastmega bakteriaalsed infektsioonid kuseteedes, põies ja neeruvaagnas. Enamasti on need põhjustatud uropatogeensete *E. coli* tüvede poolt, (ingl k., *uropathogenic E. coli*, UPEC) mis koloniseerivad urotrakti epiteeli ja moodustavad biofilmi, et vältida peremeesorganismi immuunsüsteemi aktivatsiooni (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Vollmerhausen & Katouli, 2014). UPEC põhjustab 70-95% ambulatoorsetest ja kuni 50% nosokomiaalsetest kuseteedeinfektsioonidest (Kucheria *et al.*, 2005).

Haiglaravil viibivate patsientide kuseteedeinfektsioonide tüsistuseks võib olla sepsis. Sepsiseks nimetatakse rasket üldinfektsiooni, kus mikroobid on tunginud vereringesse ning paljudes võivad levida erinevatesse organitesse. Kirjanduse andmetel on *E. coli* poolt põhjustatud suremus sepsisesse kuni 22% (Rojas *et al.*, 2013). Vastsündinutel võib patogeenne *E. coli* põhjustada ajukelme põletikku ehk meningiiti. Lapsed saavad infektsioonitekitajad sünnituse ajal emalt, või ka keskkonnast. *E. coli* poolt põhjustatud vastsündinute meningiidi suremus on 10-15% (Gaschignard *et al.*, 2013).

#### **1.1.1.2 Soolesised infektsioonid**

Soolesiseid infektsioone tekitav *E. coli* (IPEC) klassifitseeritakse erinevate tunnuste alusel (geneetilised ja fenotüübilised markerid, haigussümptomid) viieks erinevaks patotüübiks: enteropatogeenseks (ingl k., *enteropathogenic E. coli*, EPEC), enteroinvasiivseks (ingl k., *enteroinvasive E. coli*, EIEC), enterotoksigeenseks (ingl k., *enterotoxigenic E. coli*, ETEC), enterohemorraagiliseks (ingl k., *enterohemorrhagic E. coli*, EHEC), enteroagregatiivseks (ingl k., *enteroaggregative E. coli*, EAEC) *E. coli* ks (Schaechter, 2009).

Enteropatogeense *E. coli* (EPEC) infektsioon põhjustab kõhulahtisust koos mõõduka palavikuga, ent

puudub verine roe. EPEC tüved on vähe levinud arenenud riikides, kuid vahel esineb toidumürgituseepideemiate korral. Madala hügeenitasemega riikides põhjustavad EPEC tüved endeemilisi diarröa puhanguid (Santona *et al.*, 2013).

Enteroinvasiivse *E. coli* (EIEC) põhjustatud diarröa meenutab *Shigella* tekitatud düsenteeriat. Kõhulahtisus on verine-limane ja väljaheites esineb leukotsüüte. EIEC tüved tungivad jämesoole epiteeli, paljunevad ja põhjustavad raku lüüsi (Beld & Reubsæet, 2012).

Enterotoksigeenne *E. coli* (ETEC) on levinud reisikõhulahtisuse tekitaja. Haiguse kulg võib olla erinev, kuid tavaliselt põhjustab ilma palavikuta vesist diarröad. Sarnaselt EPEC tüvedele on see peamiselt levinud arenguriikides (Vilchez *et al.*, 2014).

Enterohemorraagiline *E. coli* (EHEC) produtseerib Shiga-taolist toksiini, mis põhjustab diarröad ning hemolüütilist-ureemilist sündroomi ja koliiti (verine kõhulahtisus). Haiguspuhangud esinevad arenenud riikides ning nakkus levib enamasti toiduainetega (Bielaszewsk *et al.*, 2013).

Enterogregatiivne *E. coli* (EAEC) seostub jämesoole epiteeliga moodustades agregate. EAEC infektsiooni korral tekib vesine kõhulahtisus, oksendamine ja dehüdratsioon. Haiguse kulg võib muutuda krooniliseks põhjustades soolestiku põletikku (Boll & McCromic, 2012).

### **1.1.2. *E. coli* fülogeneetiline kuuluvus**

Kommensaalsed ja patogeensed *E. coli* tüved kuuluvad enamasti nelja suuremasse fülogeneetilisse ehk evolutsioonilisse gruppi. Need grupid on: A, B1, B2 ja D (Clermont *et al.*, 2000). Kõikide gruppide eellaseks on B2, millest ajaliselt esimesena eristus grupp D (Lecointre *et al.*, 1998). Grupid A ja B1 on õdegrupid ning kujunesid hiljem kui grupp D (Gordon *et al.*, 2008). Lisaks neile on olemas veel grupid C ja E, kuid need on vähe levinud (Escobar-Páramo *et al.*, 2004).

Ühte ja samasse fülogeneetilisse gruppi kuuluvad tüved on saranased mitme tunnuse poolest: energiaallika eelistus, antibiootikum-tundlikus, genoomi suurus, virulentsusgeenid (Gordon, 2004). Suurema genoomiga B2 ja D grupi tüved omavad erinevaid virulentsusgeene rohkem kui gruppide A ja B1 tüved (Bergthorsson & Ochman, 1998; Duriez *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2008). Antibiootikumi tundlikud tüved kuuluvad peamiselt gruppi B2 ning omavad rohkem erinevaid virulentsusgeene kui resistentsed tüved, mis kuuluvad sageli gruppidesse D ja A (Cooke *et al.*, 2010). Kirjanduse andmetel on saadud ka vastupidiseid tulemusi, kus resistentsed tüved kuuluvad põhiliselt gruppi B2. Näiteks antibiootikum-resistentne pandeemiline *E. coli* kloon (ST131) kuulub ainult B2 fülogeneetilisse gruppi (Olesen *et al.*, 2013; Brolund *et al.*, 2013).

Enamasti kuuluvad patogeensed sooleväliseid infektsioone põhjustavad *E. coli* tüved gruppi B2 ja vähem gruppi D ning harva seostatakse neid gruppidega A ja B1. Soolesiseseid infektsioone põhjustavad ja toksiine produtseerivad *E. coli* d (EHEC, ETEC, EIEC) kuuluvad sageli gruppidesse A ja B1 ning harva gruppidesse B2 ja D. Kroonilist ja kergest diarröad põhjustavate patotüüpide nagu EPEC ja EAEC tüved kindlatesse fülogeneetilistesse gruppidesse ei kuulu ning jaotuvad kõikide gruppide vahel (Escobar-Páramo *et al.*, 2004).



## 1.2. Antibiootikumid

Antibiootikumid on mikroobide elu pärssivad (bakteriostaatilised) või neid surmavad (bakteritsiidsed) ained, mis tekivad bakterite ja seente ainevahetusproduktidena või on tööstuslikult sünteesitud (Bush K<sup>B</sup>, 2012).

Neid antimikroobse toimega aineid kasutatakse raviks ehk kemoteraapiaks, kemoprofülaktilikaks ja kemosanatsiooniks ehk mikroobikandluse kõrvaldamiseks. Tänapäevaks on kirjeldatud palju erinevaid laborites sünteesitavaid antibakteriaalseid preparaate, mis erinevad oma keemilise koostise ja bakteritevastase toime poolest (Lutsar *et al.*, 2007; Bush K<sup>B</sup>, 2012).

### 1.2.1. Beeta-laktaam antibiootikumid

Beeta-laktaamid on laia toimespektriga bakteritsiidsed antibiootikumid, mis mõjutavad nii gram-positiivsete kui gram-negatiivsete mikroobide rakuseinas peptidoglükaani sünteesi (Bush<sup>A</sup>, 2012). Beeta-laktaam antibiootikumid on nimetuse saanud  $\beta$ -laktaamtuuma järgi. Antud struktuur koosneb neljast molekulist, mille küljes võib olla viie- või kuueliikmeline heterotsükiline rõngas. Bakteritsiidne toime tuleneb antibiootikumi võimest seonduda kovalentselt mikroobi rakuseina vastava retseptoriga, mida nimetatakse penitsilliini siduvaks valguks (ing k., *penicillin-binding protein*, PBP). Beeta-laktaam antibiootikumi seondumisel PBP-ga inhibeeritakse transpeptidatsiooni reaktsioon ning peptidoglükaani süntees seiskub. Lisaks kahjustavad rakuseina erinevad hüdroksüülradikaalid. Lõpptulemuseks on bakteriraku lüüsumine (Bush<sup>A</sup>, 2012).

Beeta-laktaam antibiootikumid jagatakse gruppidesse tuumaga ühendatud rõnga struktuuri järgi: penitsilliinid, tsefalosporiinid, monobaktaamid ja karbapeneemid. Tsefalosporiine jaotatakse omakorda põlvkondadesse vastavalt nende antimikroobse aktiivsuse spektrile. Esimene põlvkond on aktiivne peamiselt Gram-positiivsete bakterite vastu, teine ning kolmas põlvkond on aktiivsemad gram-negatiivsete bakterite vastu. Neljanda põlvkonna tsefalosporiinid on laiendatud aktiivsusega (Bush<sup>A</sup>, 2012). Monobaktaamid toimivad gram-negatiivsete mikroobide vastu. Karbapeneeme kasutatakse nii gram-positiivsete kui ka gram-negatiivsete bakterite poolt põhjustatud infektsioonide raviks (Bush<sup>A</sup>, 2012; Bush<sup>B</sup>, 2012).

Beeta-laktaam antibiootikumide antimikroobse toime suurendamiseks kasutatakse neid tihti kombineerituna klassikaliste  $\beta$ -laktamaasi inhibiitoritega (tasobaktaam, sulbaktaam, klavulaanhape). Sulbaktaam ja tasobaktaam on sulfoonid, klavulaanhape on klavaam ning nende ühiseks tunnuseks on  $\beta$ -laktaamile sarnane tuum. Inhibiitorid seostuvad  $\beta$ -laktamaasi aktiivsaitide konserveerunud jääkidega, hoides seni mikroobi ensüümi inaktiivsena kuniks  $\beta$ -laktaam antibiootikum inhibeerib PBP valke ja peatab raku peptidoglükaani sünteesi. Eraldi kasutatuna on neil nõrk antibakteriaalne toime, kuid koos  $\beta$ -laktaamidega muudavad ravi efektiivsemaks (Bush<sup>B</sup>, 2012; Drawz *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Resistentsuse mehhanismid beeta-laktaam antibiootikumidele

Mikroobide antibiootikum-resistentsuse korral antibiootikumid ei suuda baktereid hävitada või nende kasvu pärssida. Resistentsus võib olla loomulik (liigi püsiv omadus) või omandatud. Omandatud resistentsus tekib geneetiliste mutatsioonide või resistentsusgeenide omandamise kaudu (Lutsar *et al.*, 2007). Mikroobide resistentsus beeta laktaamantibiootikumidele on seotud erinevate mehhanismidega: pumpade abil aktiivne efluks, PBP valkude modifitseerimine, membraani permeaabluse muutmine jne (Bush<sup>A</sup>, 2012).

Enterobakterites, sealhulgas ka *E. coli*'s on üheks levinud mehhanismiks ensüümi  $\beta$ -laktamaasi produktsioon. Need ensüümid hüdrolüüsivad neljast aatomist koosneva  $\beta$ -laktaamtuuma struktuuri lisades sinna vee molekuli ning deaktiveerivad ravimi antibakteriaalsed omadused (Abraham & Chain, 1940). Beeta-laktamaasi geenide (*bla*) ekspressioon võib olla pidev või indutseeritud. Sõltuvalt  $\beta$ -laktamaasi geeni asukohast ja ekspresseeritavast ensüümist on leitud erinevusi. Gram-negatiivsetes mikroobides on täheldatud indutseeritud ekspressiooni kromosoomis paiknevate *bla* geenide puhul ning pidevat ekspressiooni plasmiidil kodeeritud  $\beta$ -laktamaaside puhul. Lisaks mõjutavad *bla* geenide ekspressiooni neid ümbritsevad geenid (Eftekhari *et al.*, 2013; Mokracka *et al.*, 2013). Sageli on  $\beta$ -laktamaase produtseerivad bakterid multi-resistentsed (ing k., *multidrug resistant pathogen*, MDR) ning on resistentsed ka teistele antibiootikumide klassidele (fluorokinoloonid, aminoglükosiidid) (Baudry *et al.*, 2009). Mõned  $\beta$ -laktamaasid on spetsiifilised penitsilliinidele (penitsillinaasid), tsefalosporiinidele (tsefalosporinaasid) või karbapeneemidele (karbapenemaasid), teised aga on võimelised inaktiveerima paljusid  $\beta$ -laktaam antibiootikume (Bush<sup>A</sup>, 2012).

Laiendatud toimespektriga  $\beta$ -laktamaasideks (ing k., *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*, ESBL) nimetatakse ensüümide gruppi, mis on võimelised hüdrolüüsima ja põhjustama resistentsust oksüimino-tsefalosporiinidele (tsefotaksiim, tseftasidiim, tseftriaksoon, tsefuroksiim ja tsefepiim-tuntud ka kui 3. ja 4. põlvkonna tsefalosporiinid) ja monobaktaamide (astreonaam) vastu, aga mitte tsefamütsiinide (tsefoksitiin ja tsefotetaan) või karbapeneemide (imipeneem, meropeneem, doripeneem ja ertapeneem) vastu. ESBL aktiivsust inhibeerivad klassikalised  $\beta$ -laktamaasi inhibiitorid: klavulaanhape, sulbaktam ja tasobaktam (Bush *et al.* 1995; Bush & Jacoby, 2010).

### 1.2.3. Beeta-laktamaasi määravate geenide evolutsioon

Beeta-laktamaase produtseerivad *Streptococcus aureus* tüved levisid 1940ndatel peale penitsilliini kasutuselevõttu.  $\beta$ -laktamaasi geenid *S. aureus* tüvedes paiknesid peamiselt kromosoomis ning olid indutseeritavad (Medeiros, 1997). Seevastu 1963. aastal Kreekas avastatud *E. coli* produtseeritud TEM-1  $\beta$ -laktamaas oli plasmiidil kodeeritud. Geeni nimetati TEM-1 patsiendi nime järgi (Temoneira), kellelt antud mikroob isoleeriti (Datta & Richmond, 1966).

TEM-1-ga suguluses olev SHV-1 identifitseeriti ligi kümme aastat hiljem. See  $\beta$ -laktamaas on biokeemiliste omaduste järgi TEM-1-ga sarnane, kuid rohkem levinud *Klebsiella spp.* tüvedel (Hall & Barlow, 2004). Peagi võis neid ensüüme leida ka teistes gram-negatiivsetes bakterites (*Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*). Mitmeid aastaid domineerisid peamiselt TEM-1, TEM-2 ja SHV-1, kuid olukord muutus alles 80ndatel, kui antud resistentsusgeenides tekkisid punktmutatsioonid. Laiast toimespektrist (ing k., *broad spectrum*) sai laiendatud toimespekter (ing k., *extended spectrum*) (Hall & Barlow, 2004).

Knothe teatas 1983. aastal Saksamaal esimesest *K. pneumoniae* tüvest, mis inaktiveeris laiendatud toimespektriga tsefalosporiine (tsefotaksiimi, tseftasidiimi). SHV-1 geenijärjestuses oli toimunud ühe nukleotiidne mutatsioon (238. positsioonis oli glütsiin asendunud seriiniga) ning sellest tulenevalt tekkis suurenenud aktiivsus. Seda geeni hakati nimetama SHV-2-ks (Knothe *et al.*, 1983; Hall & Barlow, 2004). Mõni aasta hiljem leiti Prantsusmaal järgmine *K. pneumoniae* tüvi, mis oli resistentne 3. põlvkonna tsefalosporiinidele (Brun-Buisson *et al.*, 1987). Sellel korral leiti geen, mis oli väga sarnane TEM-1 ja TEM-2 geenijärjestustega ning tegemist oli TEM tüüpi laiendatud aktiivsusega  $\beta$ -laktamaasiga (Datta & Kontomichalou, 1966; Hall & Barlow, 2004).

Seoses uute SHV- ja TEM derivaatide kindlakstegemisega 1980ndate teises pooles võeti ametlikult kasutusele ka uus mõiste – laiendatud-spektriga  $\beta$ -laktamaas, ESBL (Philippon *et al.*, 1989; Giske *et al.*, 2009). Sama kümnendi lõpus leiti uus ESBL geen, mis ei kuulunud SHV ega TEM perekonda (Bauernfeind *et al.*, 1990; Hall & Barlow, 2004). Jaapanis isoleeriti aastal 1986 farmakokineetikalabori katseloomalt *E. coli*, mis produtseeris ESBL-i, mida nimetati FEC-1-ks (Matsumoto *et al.*, 1988). Mõni aasta hiljem avastati sarnane tsefotaksiimi resistentne tüvi Saksamaalt, kuid seda hakati nimetama tema ensümaatilise aktiivsusest tulenevalt CTX-M-1-ks (Bauernfeind *et al.*, 1990). Paari aasta jooksul teatati teistest sarnastest leidudest, kuid selgus tuli aastal 1996, kui antud järjestused sekveneeriti ja võrreldi. Tulemused näitasid, et need ESBL-id on omavahel sarnased kuuludes samasse perekonda. Selle ESBL perekonna jaoks jäeti kasutusele nimetus CTX-M (Bauernfeind *et al.*, 1996).

CTX-M geenijärjestusi võrreldes leiti sarnasus enterobakteri *Klyvera sp.* kromosoomis KLUC-1 geeniga. Tõenäoliselt levis *Klyvera* bakterist antud geen plasmiidide või teiste mobiilsete elementide vahendusel mõnda patogeensesse liiki ja kandus sealt omakorda horisontaalselt edasi (Decousser *et al.*, 2001). CTX-M perekond erineb SHV ja TEM perekondadest koosnedes mitmest kompleksest mitte-homogeensest grupist ehk klastrist (Bonnet, 2004). Klastritesse ehk gruppidesse jagunevad CTX-M-id aminohappe järjestuse sarnasuse alusel. Gruppe on kokku viis ning igasse kuulub kümneid plasmiidil kodeeritud ensüüme: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ja CTX-M-25 (Tabel 1; Bonnet, 2004).

Samasse gruppi kuuluvad on sarnased vähemalt 94% või rohkem ning erinevatesse gruppidesse kuuluvad on sarnased kuni 90% (Bonnet, 2004). CTX-M klastrite evolutsioonilisi kaugusi võrreldes leiti, et hargnemine toimus varakult ning ilmselt ühisest eellasest. Nagu TEM ja SHV perekondades, tekivad uued CTX-M-id järjestustes toimuvate punktmutatsioonide tõttu (Bonnet *et al.*, 2000).

**Tabel 1.** Erinevatesse klasteritesse kuuluvad *bla*<sub>CTX-M</sub> (Bonnet et al., 2004)

CTX-M klaster	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -28, -22
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, TOHO-1
CTX-M-8	CTX-M-8
CTX-M-25	CTX-M-25, -26
CTX-M-9	CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, TOHO-2, -65

Käesoleva aasta alguseks oli CTX-M-i variante detekteeritud ligi 150, SHV-sid ligi 180 ja TEM-tüüpi ensüüme 200 ringis (<http://www.lahey.org/studies/>). Lisaks neile on ESBL-id perekondadest PER, VEB, GES, IBC, TLA-1, kuid need on vähem levinud (Bonnet, 2004).

#### 1.2.4. Beeta-laktamaaside klassifikatsioon

Molekulaarsed meetodid on teinud võimalikuks paremini kirjeldada  $\beta$ -laktamaaside aminohappelist järjestust ning nende hüdrofüüsilist aktiivsust. Selle tõttu on kasutusel mitu  $\beta$ -laktamaaside klassifikatsiooni süsteemi (Jacoby & Medieros, 1991; Giske *et al.*, 2009; Bush & Jacoby, 2010).

Beeta-laktamaaside klassifitseerimiseks on kasutusel kaks süsteemi: Ambleri molekulaarne klassifitseerimisskeem ja Bush-Jacoby-Medieros funktsionaalne süsteem ja (Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010). Nende järgi kuuluvad ESBL-id Ambleri molekulaarsesse klassi A, funktsionaalsesse klassi 2be, on klavulaanhappe poolt inhibeeritud ning on võimelised inaktiveerima oksüimino-tsefalosporiine (Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010).

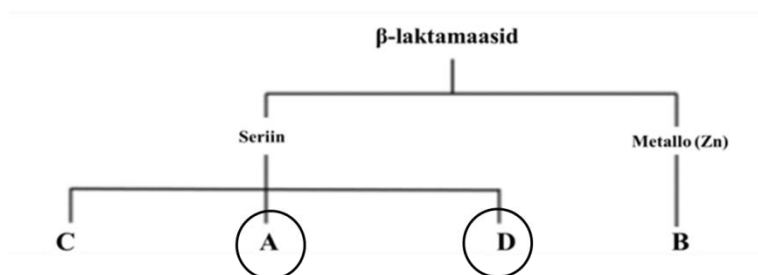
Ambleri valgustruktuurist lähtuv skeem on kõige lihtsam ning vähem vastuoluline klassifitseerimise võimalus. Seejuures ei anna selline lähenemine vajalikku informatsiooni ensüümide omaduste kohta, mis on olulised ravi määramiseks (Bush & Jacoby, 2010). Aastal 1989 loodud ja hiljem täiendatud Bush-Jacoby-Medieros funktsionaalne süsteem pole ideaalne (Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010). Selle kohaselt jäävad ESBL grupist välja uuemad  $\beta$ -laktamaasid, mille toimespekter on ka laiendatud: AmpC, OXA-tüüpi tsefalosporinaasid, metallo- $\beta$ -laktamaasid, OXA-tüüpi karbapenemaasid, *K. pneumoniae* klass A karbapenemaasid (KPC) ja teatud GES  $\beta$ -laktamaasi variandid (Giske *et al.*, 2009). Selle tõttu pakkus Giske *et al.* (2009) välja veel ühe klassifikatsiooni skeemi, mis süstematiseerib ka uued ESBL-id.

Giske poolt pakutud süsteemi eesmärk on lihtsustada ensüümide süstematiseerimist kliiniliste laborite jaoks. See ei ole mõeldud eelmisi klassifikatsioonisüsteeme asendada, vaid kui lisavahend infektsioonkontrollile ning teistele tervishoiu professionaalidele töö lihtsustamiseks.

Klassikaline ESBL definitsioon on aegunud, sest ensüüme on aastate jooksul juurde tekkinud. Selle järgi jäävad ESBL grupist välja kliiniliselt olulised uued  $\beta$ -laktamaasid, millel on aktiivsus laiendatud toimespektriga tsefalosporiinide ja/või karbapeneemide vastu (Giske *et al.*, 2009).

#### 1.2.4.1. Ambleri skeem

Ambleri skeem jagab  $\beta$ -laktamaasid nelja suurde molekulaarsesse klassi (A, B, C ja D) (joonis 1). Jaotuse aluseks on valgujärjestuste homoloogsus (aminohappeline sarnasus). Klassidesse A, C ja D kuuluvad seriin  $\beta$ -laktamaasid. Need  $\beta$ -laktamaasid inaktiveerivad  $\beta$ -laktaam antibiootikume seriini kaudu. Klassi B kuuluvad metallo- $\beta$ -laktamaasid, mis vajavad kahevalentset Zniooni substraadi hüdrolyüsiks. Enamus ESBL-e kuuluvad klassi A (TEM, SHV ja CTX-M) ja on inhibeeritud  $\beta$ -laktamaasi inhibiitorite poolt. Klassi D kuuluvad OXA ensüümid on ka ESBL-id, kuid inhibiitoritel on neile nõrgem mõju (Ambler *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010).



**Joonis 1.** Ambleri skeem. Ringidega tähistatud klassidesse kuuluvad ESBL-id (Ambler *et al.*, 1991).

#### 1.2.4.2. Bush-Jacoby-Medieros süsteem

Bush-Jacoby-Medieros süsteem grupeerib  $\beta$ -laktamaasid funktsionaalse sarnasuse alusel gruppidesse (substraadi ja inhibiitori profiilide põhjal). Teisisõnu on ensüümid grupeeritud viisil, kus sarnase fenotüübiga isolaadid kuuluvad ühte gruppi. Põhigruppe on kokku kolm (1, 2 ja 3) ning igal põhigrupil on mitu alagruppi (Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010) (joonis 2).

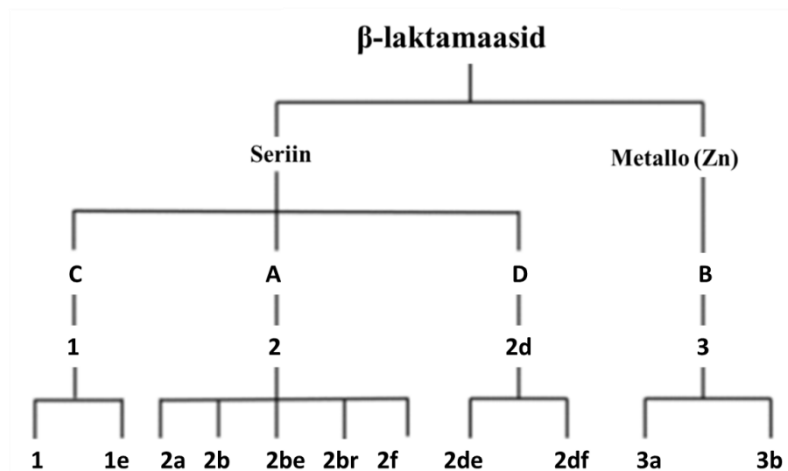
Esimesse gruppi (Ambleri klass C) kuuluvad nii kromosoomil kui plasmiidil kodeeritud tsefalosporinaasid, mis on laialt levinud erinevates enterobakterite liikides. Selle klassi ensüümid on aktiivsemad nii tsefalosporiinide kui bensüülpenitsilliinide vastu ning tavaliselt resistentsed klavulaanhappele (Bush & Jacoby, 2010).

Teise gruppi (Ambleri klassid A ja D) kuuluvad  $\beta$ -laktamaasid on sarnased esimese grupiga, aga erinevalt neist reageerivad klavulaanhappele. Teisel grupil on ka kõige rohkem alagruppe: 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e ja 2f.

Alagruppi 2b kuuluvad  $\beta$ -laktamaasid hüdrolyüsivad vabalt penitsilliine ja esimesi tsefalosporiine ning on tugevalt inhibeeritud klavulaanhappe ja tasobaktaami poolt. Sellesse gruppi kuuluvad ensüümid, mis levisid 1970-80ndatel (TEM-1, TEM-2 ja SHV-1). Sellest järgmine alagrupp 2be moodustub ESBL-idest (CTX-M, SHV- ja TEM-derivaadid), mis on samamoodi aktiivsed penitsilliinidele, tsefalosporiinidele nagu 2b grupi ensüümid, kuid lisaks hüdrolyüsivad need oksüimino- $\beta$ -laktaame nagu tsefotaksiim, tseftasidiim ja astronaam. Lisaks kuuluvad sellesse alagruppi vähem tuntud ESBL-

id nagu BEL-1, BES-1, SFO-2, TLA-1, TLA-2, PER ning VEB perekondade ensüümid. Kliinilises praktikas kasutatakse 2be grupi ESBL-ide määramisel klavulaanhappe inhibitsiooni (Bush & Jacoby, 2010).

Kolmandasse gruppi (Ambleri klass B) koonduvad metallo- $\beta$ -laktamaasid (MBL), mis on võimelised hüdrolüüsima kolmanda põlvkonna tsefalosporiine ja karbapeneeme, kuid mitte monobaktaame. Teistest  $\beta$ -laktamaasidest erinevad struktuuri poolest ning on inhibeeritud raskemetalli kelaatori (ing k., *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) poolt, mitte klavulaanhappe poolt nagu ESBL-id. Tänapäeval on globaalselt tuntud VIM ja IMP perekondade esindajad (Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010).



**Joonis 2.** Bush-Jacoby-Medieros süsteem koos Ambleri klassidega (Bush & Jacoby, 2010).

#### 1.2.4.3. Giske klassifikatsioon

Giske *et al.*, (2009) välja pakutud süsteem jaotab ESBL-ide kolme suurde klassi:  $ESBL_A$ ,  $ESBL_M$  ja  $ESBL_{CARBA}$  (tabel 2). Giske  $ESBL_A$  klassi kuuluvad „klassikalised ESBL-id“ (CTX-M, SHV ja TEM perekondade derivaadid ehk Ambleri klass A, Bush-Jacoby-Medieros süsteemi 2be alagrupp) (Bush & Jacoby, 2010).  $ESBL_M$  (ing k., *miscellaneous* ehk mitmesugused) klassi kuuluvad jagatakse eraldi kahte kategooriasse:  $ESBL_{M-C}$  (plasmiid kodeeritud AmpC; Ambleri klass C) ja  $ESBL_{M-D}$  (OXA- tüüpi ESBL-id; Ambleri klass D). Giske paigutab ESBL-ide, millel on hüdrolüütiline aktiivsus karbapeneemide vastu klassi  $ESBL_{CARBA}$ . Neid jagatakse kolme kategooriasse:  $ESBL_{CARBA-A}$  *Klebsiella pneumoniae* klass A karbapenemaas (KPC),  $ESBL_{CARBA-B}$  (metallo- $\beta$ -laktamaasid) ja  $ESBL_{CARBA-D}$  (OXA-ESBL) (Giske *et al.*, 2009).

**Tabel 2.** Beeta-laktamaasid, millel on hüdrolüütiline aktiivsus laiendatud toimespektriga tsefalosporiinidele ja/või karbapeneemidele (Giske *et al.*, 2009)

ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>	ESBL <sub>CARBA</sub>
Levinud: CTX-M TEM-ESBL-id SHV-ESBL-id VEB PER	ESBL <sub>M-C</sub> (plasmiid AmpC): CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	ESBL <sub>CARBA-A</sub> : KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1,-2
Vähe levinud: GES-1,-3,-7,-9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT	ESBL <sub>M-D</sub> : OXA-10-grupp OXA-13-grupp OXA-2-grupp OXA-18 OXA-45	ESBL <sub>CARBA-B</sub> : IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1  ESBL <sub>CARBA-D</sub> (OXA-karbapenemaasid): OXA-23-grupp OXA-24-grupp OXA-48b OXA-58-grupp

### 1.3 Laiendatud beeta-laktamaasi määravate geenide epidemioloogia

#### 1.3.1 Beeta-laktamaasi produtseerivate *E. coli* tüvede reservuaarid ja ülekanne

ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede reservuaarideks võivad olla inimesed, loomad ja keskkond. Inimese kõige suuremaks antibiootikum-resistentsete mikroobide reservuaariks on seedetrakt. Prantsusmaal tehtud uuringus leiti, et 6% inimesest on koloniseeritud ESBL-positiivsete tüvedega. Seedetraktist isoleeritud mikroobid produtseerisid sarnaselt patogeensetele tüvedele kõige enam CTX-M ja SHV grupi erinevaid variante (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2013). ESBL-positiivsed mikroobitüved põhjustavad ka erinevaid hospitaalinfektsioone (Rettedal *et al.*, 2012; Knudsen *et al.*, 2014). On kindlaks tehtud, et infektsioonirisk on kõrgem intensiivravi- ja hematoloogia osakondades (Rogers *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2013; Gibold *et al.*, 2014). Peamisteks mikroobi levitajateks on personal ning ambulatoorsed haiged, kuid ülekanne võib toimuda ka meditsiiniseadmete kaudu ja invasiivsete protseduuride käigus/ajal (Schaechter, 2009; Rogers *et al.*, 2011; Knudsen *et al.*, 2014).

ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede reservuaariks on ka loomad ja linnud. Kõige lihtsam resistentse bakteri ülekanne võib toimuda inimese otsesel kokkupuutel mikroobi kandva loomaga (Hiroi *et al.*, 2012; Kola *et al.*, 2012). Teine võimalus nakatumiseks on farmis kasvatatud looma- ja linnuliha

tarbimine ning selle kaudu mikroobidega nakatumine. Hollandis läbiviidud linnuliha uuringud on näidanud, et võimalikud edasikantavad mikroobid omavad peamiselt CTX-M-1 klasteri geene ja mõningaid SHV- ja TEM-derivaate (Kluytmans *et al.*, 2012). Sarnane uuring on läbi viidud ka Saksamaal Kola *et al.* (2012) poolt, kus lihas leiti ESBL-positiivseid enterobaktereid. Suurenenud resistentsete enterobakterite osakaal võib olla seotud rohke antibiootikumide kasutamisega farmiloomadel ja lindudel.

Loomade ja ka inimese organismist levivad resistentsed bakterid väljaheite kaudu pinnavette. Selle tõttu on uuritud pinnase- ja heitvett kui võimalikku ESBL-positiivsete mikroobide allikat. Uuringu tulemused näitasid, et ümbertöödeldud või puhastatud vesi võib olla üheks potentsiaalseks ESBL-mikroobide allikaks (Dolejska *et al.*, 2012).

### 1.3.1.1 Beeta-laktamaasi produtseerivate *E. coli* tüvede ESBL geenide ülekanne

Plasmiidid on autonoomselt replitseeruvad ekstrakromosomaalsed DNA elemendid, mis kannavad erinevaid virulentsus- ja resistentsusgeene tagades mikroobi ellujäämise ebasoodsates keskkonnatingimustes. Geenide liikumine võib toimuda plasmiidilt kromosoomi ja vastupidi, kasutades selleks teisi geneetilisi elemente nagu transposoone ja integrone.

Tänaseks on teada, et  $bla_{ESBL}$  geenide levik mikroobi populatsioonide vahel sõltub paljudest teguritest. Nende geenide edasikandumine ei ole seotud ühe kindla determinandiga, vaid edukas levik on tagatud mitme faktori (fülogeneetiline päritolu, virulentsus, plasmiidid) kombineerumisel (Branger *et al.*, 2005; Baudry *et al.*, 2009).

Plasmiidid, millega  $bla_{ESBL}$  geenid edasi kanduvad varieeruvad bakterites nii arvu kui suuruse poolest (50 kuni 170 kb) (Trang *et al.*, 2013). Enamasti asuvad  $bla_{ESBL}$  geenid suurematel plasmiididel ning samal plasmiidil võib olla mitu  $bla$  geeni. Üheks levinud kombinatsiooniks on  $bla_{CTX-M}$  ja  $bla_{TEM}$  (Trang *et al.*, 2013). Selline kahe  $bla$  geeni koos liikumine tuleneb transposoonist, millega  $bla_{TEM}$  levib ning mis sageli asub  $bla_{CTX-M}$ -iga samal plasmiidil (Boyd *et al.*, 2004). Lisaks transposoonidele võib *E. coli* tüvedes  $bla_{ESBL}$  olla ka integronidel. Peamiselt on  $bla_{ESBL}$  geene leitud klass 1 integronide struktuuris (Coque<sup>A</sup> *et al.*, 2008).

Kõik plasmiidid ei ole ühtmoodi võimelised ESBL geene säilitama ja levitama. Teatud mitesobivusgruppi kuuluvad plasmiidid kannavad antud geene teistest sagedamini. Laia peremeesulatusega plasmiid IncN on omane *K. pneumoniae* ESBL tüvedele, kuid vahel on neid leitud ka *E. coli* dest. Seda tüüpi plasmiididel on tavalised  $bla_{CTX-M}$  geenid, kuid on tuvastatud ka  $bla_{SHV}$  geene. Viimast on veel seostatud IncA/C-tüüpi plasmiidiga, mis on samamoodi laia peremeesulatusega (Younes *et al.*, 2010; Markovska *et al.*, 2013). IncN, IncA/C ja teiste sarnaste plasmiidide levik on üheks võimalikus põhjuseks, miks ESBL-id erinevates *E. coli* populatsioonides nii edukalt levinud on (Novais *et al.*, 2007).

Seevastu on globaalselt domineeriv  $bla_{CTX-M-15}$  seotud kitsa peremeesulatusega IncF-tüüpi konjugatiivse plasmiidiga (Markovska *et al.*, 2013). See plasmiid kannab enamasti FIA, FIAB ja FII-



replikone ning omab ka antibiootikum-resistentsuse geene tetratsükliinide, aminoglükosiidide, fluorokinoloonide vastu. Seda tüüpi plasmide on tuvastatud sagedamini multiresistentsetes bakterites (Baudry *et al.*, 2008; Markovska *et al.*, 2013; Trang *et al.*, 2013). Sarnaselt CTX-M-15-le asub teinegi Euroopas laialdaselt levinud ESBL geen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> enamasti kindlat tüüpi plasmiidil (IncK), sageli on seal ka  $\beta$ -laktamaas *bla*<sub>TEM-1</sub> (Machado *et al.*, 2013).

#### **1.3.1.2. *E. coli* klonaalne levik (Sequence Type 131 O25:H4)**

*E. coli* puhul on täheldatud, et lisaks fülogeneetilisele kuuluvusele, geneetilistele elementidele ja plasmiididele on *bla*<sub>ESBL</sub> geenide leviku jaoks oluline ka isolaadi klonaalne kuuluvus. Kloonid on tüved, mis on geneetiliselt väga sarnased ning suguluses, omades väga sarnast nukleiinhappe järjestuse tüüpi (ing k., *sequence type*, ST) (Tenover *et al.*, 1995).

Viimasel kümnendil on avaldatud mitmeid artikleid pandeemilise ESBL-positiivse *E. coli* klooni ST131 O25:H4 levikust (Coque<sup>A</sup> *et al.*, 2008; Dolejska *et al.*, 2011; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2013). Antud klooni pandeemiline levik tehti kindlaks 2007. aastal, kasutades multilookus järjestuse tüpiseerimis meetodit (ing k., *Multilocus Sequence Typing*, MLST), et uurida erinevatelt kontinentidelt isoleeritud ESBL-e produtseerivate *E. coli* de päritolu (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2007). Molekulaarsed uuringud on näidanud, et ST131 tüved omavad ühiseid virulentsus- ja resistentsusgeene (Hussain *et al.*, 2012).

*E. coli* ST131 O25:H4 iseloomustab kuulumine virulentsesse fülogeneetilisse gruppi B2 ning kloon kannab sageli IncF plasmidi koos erinevate antibiootikumresistentsuse geenidega (Karim *et al.*, 2001; Pitout *et al.*, 2005; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Karim *et al.* (2001) poolt raporteeriti Indias CTX-M-15 olemasolust esmakordselt. See ESBL on tekkinud CTX-M-3-st ühe aminohappe asendusel positsioonil 240 (Asp->Gly), mis suurendas tema katalüütilist aktiivsust tseftasidiimi suhtes. *E. coli* ST131 produtseerib sageli CTX-M-1 klastrisse kuuluvat CTX-M-15-st, kuid on leitud ka teistesse klastritesse kuuluvaid geene (Brisse *et al.*, 2012). Lisaks on ST131 sageli ka fluorokinoloonidele resistentne (Rogers *et al.*, 2011).

ST131 geneetilised omadused on taganud ellujäämise ja leviku erinevates keskkondades. Arvatakse, et tänu suurenenud  $\beta$ -laktaamide kasutusele toimus selle konkreetse klooni väljaselekteerumine. Pitout *et al.*, (2009) on uurinud ST131 geograafilise leviku seost inimeste reisimisega. Leiti, et enim on ST131 CTX-M-15 positiivsete tüvede kandjad naasnud Põhja-Ameerikasse reisilt Aasia erinevatest piirkondadest (India, Pakistan), Aafrikast ja Euroopast. Antud piirkondades võivad paikneda potentsiaalsed reservuaarid, kust toimub turistide vahendusel klooni edasikandumine.

#### **1.3.3. Levik Euroopas**

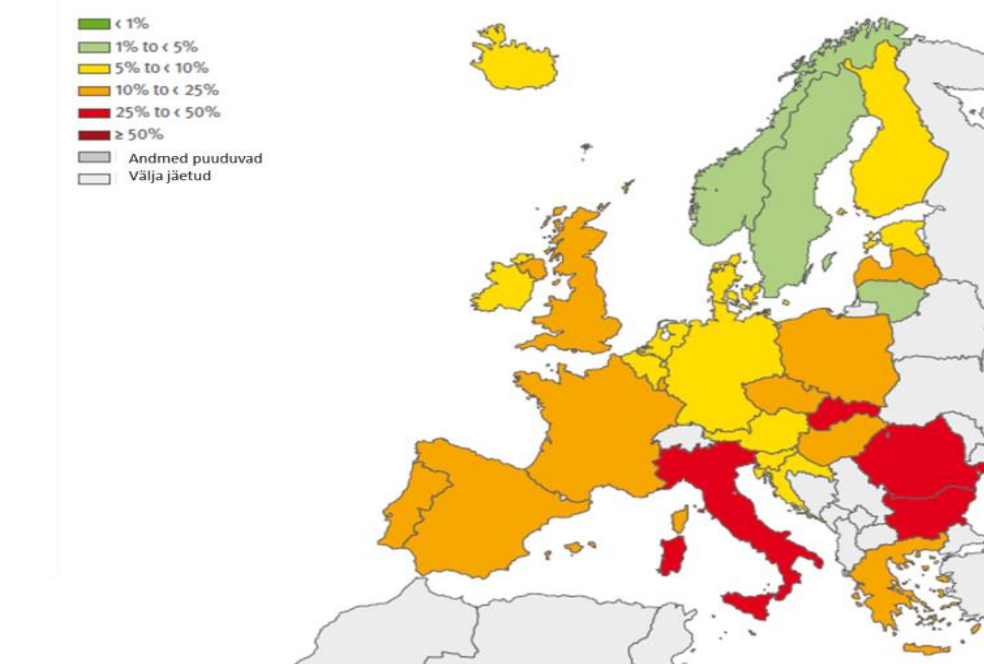
Euroopas oli 1980ndatel ESBL-ide peamiseks produtseerijaks hospitaalinfektsiooni puhanguid põhjustav *K. pneumoniae* ja olmelisi infektsioone põhjustav *E. coli*. Enamus tuvastatud ESBL-idest olid TEM-1, TEM-2 ja SHV-1 erinevad derivaadid. Alates 90ndate algusest  $\beta$ -laktamaaside

epidemioloogia muutus, sest domineerima hakkas uus ESBL perekond CTX-M ning TEM ja SHV tüüpi ESBL-id jäid tahaplaanile (Bonnet, 2004; Gibold *et al.*, 2014).

Euroopa antimikroobse resistentsuse järelevalve süsteemi (ing k., European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS-Net) 2013. aastal publitseeritud raporti andmetel on *E. coli* resistentsus 3. põlvkonna tsefalosporiinidele riigiti erinev (joonis 3). Madalam resistentsus on Skandinaavias (1-5%) ning tunduvalt kõrgem Lõuna-Euroopas (üle 50%). Seejuures suurem enamus (85-100%) 2012. aastal EARS-Net-ile raporteeritud 3. põlvkonna tsefalosporiini resistentsetest tüvedest olid ESBL-positiivsed (ECDC, 2013).

Euroopat iseloomustav trend on klastrisse CTX-M-1 kuuluva ensüümi CTX-M-15 domineerimine, millele järgneb klastrisse CTX-M-9 kuuluv CTX-M-14 (Gibold *et al.*, 2014; Markovska *et al.*, 2013). Sellist olukorda on täheldatud mitmes riigis nagu Prantsusmaal, Portugalis, Hispaanias (Novais *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2013; Gibold *et al.*, 2014).

Skandinaavias oli esimene suurem ESBL-positiivsete bakterite puhang 2005. aastal Rootsis. Selle põhjustajaks oli klonaalne MDR *K. pneumoniae*, mis produtseeris CTX-M-15-t. See näitas, et epideemiline ESBL-positiivsete mikroobide puhang tekib ootamatult ka piirkondades, kus on madal antibiootikumide selekteeriv surve ning kus MDR mikroobide levimus on madal (Lytsy *et al.*, 2008). CTX-M-15 produtseerivate *Klebsiella*-de levik antud piirkonnas mõjutas ka *E. coli*-de resistentsust, sest peale nimetatud puhangu toimus *E. coli*-des tsefalosporinaasi AmpC produktsiooni asendumine CTX-M-15-ga (Starlander *et al.*, 2014). Ka teistes Põhjamaa riikides nagu Norras ja Taanis on levinud samade ESBL geenidega MDR mikroobid (Rettedal *et al.*, 2012; Olesen *et al.*, 2013).



**Joonis 3.** EARS-Net-il raporteeritud 3. põlvkonna tsefalosporiinidele resistentsete *E. coli* tüvede esinemissagedus (%) erinevates Euroopa riikides, 2012 andmed (ECDC, 2013).

### 1.3.3.1. Levik Ida-Euroopas ja Baltimaades

Ida-Euroopa riikides viidi 2004-2010 aastal läbi tigetsükliini ja teiste antibiootikumide resistentsuse seire nimega T.E.S.T. (ing k., *The Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*, T.E.S.T.). Eelpool nimetatud uuringu andmetel oli ligi 15% isoleeritud *E. coli* tüvedest fenotüübi järgi ESBL-positiivsed. Kõrgeim ESBL-positiivsete *E. coli* de osakaal tehti kindlaks Türgis (25%), Poolas (17,2%), Bulgaarias (15,7%) ja Rumeenias (12,2%) (Balode *et al.*, 2013).

Baltimaades ja Venemaal on läbi viidud üksikud ESBL geenide uuringud. Leedus Seputiene *et al.* (2010) poolt läbi viidud ESBL tüvede molekulaarne uuring näitas, et domineerisid CTX-M-15 produtseerivad *E. coli* d. Leiti ka mõningad erinevused, nimelt identifitseeriti vähem CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2, CTX-M-1 positiivseid ja enam CTX-M-92 isolaate kui mujal Euroopas. Lätis kirjeldasid Dumpis *et al.* (2010) esimest ESBL positiivsete tüvede poolt põhjustatud haiglainfektsiooni puhangut, kus isoleeriti kлонаalne *K. pneumoniae* CTX-M-15.

Venemaal on ESBL tüvesid uurinud Edelstein *et al.*, (2003) ning leidnud, et erinevates piirkondades isoleeritud *E. coli* tüvedes domineerisid sarnaselt CTX-M-1 (93%) ja CTX-M-2 (7%) klastrite geenid. Eestis kliinilistest materjalidest isoleeritud ja fenotüübi järgi määratud *E. coli* de resistentsus on pigem kõrge, sarnanedes rohkem Kesk- ja Lõuna-Euroopale kui Skandinaaviale (EARS-Net 2013). Seni on Eestis piirdunud verest isoleeritud Gram-negatiivsete mikroobide antibiootikum-resistentsuse ja geenikassettide uurimisega (Lõivuke *et al.*, 2006; Stsepetova *et al.*, 2006; Sepp *et al.*, 2009). Andmed ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede epidemioloogia kohta Eestis puuduvad. Sarnane olukord on ka naaberriikides Leedus, Lätis ja Venemaal, kus ESBL produtseerijate kohta on andmeid vähe.

## 1.4. Laiendatud beeta-laktamaaside määramine

### 1.4.1. Fenotüübilised meetodid

*E. coli* ja teiste enterobakterite jaoks on kasutusel erinevaid ESBL produktsiooni tuvastamise teste. ESBL tootjate kindlakstegemine on keeruline, sest  $bla_{ESBL}$  geenid on erineval tasemel ekspresseeritud (Eftekhari *et al.*, 2012; Mokracka *et al.*, 2013). Seejuures on antibiootikum-tundlikkuse profiil mõjutatud ka teistest resistentsuse mehhanismidest (Bush *et al.*, 1995; Bradford, 2001; Livermore, 2008).

Antimikroobse tundlikuse testimise euroopa komitee (ing k., *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) ja Ameerika Ühendriikides asuva kliiniliste ja laboratoorsete standardite instituudi (ing k., *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) soovitatud strateegiad enterobakterite ESBL produktsiooni määramiseks on sarnased. Mõlemad soovivad meetodit, mis koosneb skriiningu ja kinnitavast testist.

Skriiningul määratakse antibiootikumitundlikus indikaator-tsefalosporiiniga (tsefotaksiim, tsefdasiim, tseftriaksoon, tsefpodoksiim). Meetodid, mida kasutatakse: (1) lahjendus-meetodid, (2) diskdiffusiooni meetod, (3) automatiseeritud süsteem (VITEK). Skriinimisel on soovitatav kasutada

vähemalt kahte erinevat tsefalosporiini, sest minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIK-id) võivad erineda sõltuvalt produtseeritavast ESBL-ist (Numanovic *et al.*, 2013; Drieux *et al.*, 2008; EUCAST, 2013).

Kui skriiningtesti järgi on mikroobi antibiootikumtundlikus vähenenud järgneb sellele kinnitav test, mis põhineb fenotüübilisel meetodil (CLSI, 2011; EUCAST, 2013).

ESBL-i produktsiooni kinnitavad testid põhinevad klavulaanhappe inhibeerival toimel. Kliinilistes laborites on kasutusel kombinatsiooni diski meetod (ing k., *combination disk test*, CDT), kaksikdiski sünergia test (ing k., *the double-disk synergy test*, DDST), E-test ehk gradiendi test, puljong mikrolahjendus meetod (ing k., *broth microdilution*) ja automatiseeritud süsteemid VITEK või MALDI-TOF (Drieux *et al.*, 2008; Numanovic *et al.*, 2013). Vahel võivad testid anda vale-positiivseid tulemusi, sest tüvedes võib esineda SHV-1, TEM-1 ja OXA-1-tüüpi  $\beta$ -laktamaaside hüperproduktsioon koos muutunud membraani permeaablusega, tekitades saranse ESBL-positiivsete fenotüübi (Giske *et al.*, 2009). Ebamäärane testi tulemus viitab suurenenud  $\beta$ -laktamaasi AmpC produktsioonile, mis varjab ESBL produktsiooni. Sellised tüved on sarnaselt ESBL-idele resistentsed 3. põlvkonna tsefalosporiinidele, kuid ei ole tundlikud klavulaanhappele. ESBL-i produktsioon võibolla maskeeritud ka karbapenemaaside (KPC, NDM) poolt (Drieux *et al.*, 2008; Reuland *et al.*, 2014).

#### **1.4.2. Genotüübilised meetodid**

Kuna fenotüübilised testid annavad sageli vale-positiivseid tulemusi ning ei määra täpset produtseeritavat ESBL ensüümi klassi on hakatud kliinilistes laborites mõtlema genotüübiliste meetodite rakendamisele. Uued meetodid, mis tuvastavad täpse ESBL-positiivse tüve genotüübi/geeni põhinevad multiplex-PCR-il, real-time PCR-il, erinevatel sekveneerimise võimalustel või mikrokiibi meetoditel. Nende eeliseks fenotüübiliste testide ees on kiirus, täpsus ja spetsiifilisus. Puuduseks on testi kallim hind ning osade meetodite puhul asjaolu, et nendega on võimalik tuvastada ainult neid  $bla_{ESBL}$  geene, mille järjestused on eelnevalt teada (Lupo *et al.*, 2013).

Kliiniliste laborite jaoks on seni üheks kõige sobivamaks genotüübiliseks ESBL kinnitustestiks pakutud kontrollpunktide meetodit (ing k., *check points method*), mis põhineb mikrokiibil. See meetod võimaldab eristada CTX-M erinevate klastrite geene ja SHV, TEM perekondade ESBL-e. Täpse TEM, SHV, CTX-M geeni kindlaks tegemiseks on vajalik sekveneerimine (Platteel *et al.*, 2011).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Magistritöö peamiseks eesmärgiks oli kliinilistest materjalides isoleeritud *E. coli* tüvede laiendatud toimega  $\beta$ -laktamaaside produktsiooni tuvastamise fenotüübiliste ja genotüübiliste meetodikatega, ESBL<sub>A</sub> geenide seos fülogeneetilise kuuluvusega ja nende epidemioloogia Balti mere piirkonnas.

#### Selleks püstitati järgmised ülesanded:

- (1) Määrata kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede fenotüübiline ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>M</sub> tootmine ja määrata ESBL<sub>A</sub> geenid (CTX-M klastrid ja *bla*<sub>SHV</sub>) ning võrrelda ESBL fenotüübiga tüvedes ESBL<sub>A</sub> geenide (*bla*<sub>CTX-M</sub> ja *bla*<sub>SHV</sub>) jaotust.
- (2) Määrata ESBL-positiivsete tüvede fülogruppidesse kuuluvus ja kloon ST131 ning seos ESBL<sub>A</sub> geenidega.
- (3) Uurida ESBL<sub>A</sub> geenide epidemioloogiat ja klooni ST131 levikut Balt mere piirkonnas.

### 2.2. Materjal ja meetodika

Töös kasutatud *E. coli* d on kogutud ARMMD (Antibiootikumresistentsuse molekulaarne multipleks diagnostika) projekti raames. Tüved koguti 20 erinevast haiglast: Eestis (n=5), Lätis (n=4), Leedus (n=3) ja Venemaal (Peterburg) (n=8) vahemikus jaanuarist maini aastal 2012. Uuringu käigus skriiniti kokku n=7774 *E. coli* tüve, millest n=4799 pärinesid statsionaarsetelt ja n=2975 ambulatoorsetelt patsientidelt. Kõik *E. coli* d skriiniti vähenenud antibiootikumi-tundlikuse tuvastamiseks vastavalt antimikroobse tundlikkuse testimise Euroopa komitee (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST 2.0) või kliiniliste ja laboratoorsete standardite instituut (ingl k., *Clinical and Laboratory Standards Institute*; CLSI 2011) kriteeriumitele.

Skriinitud *E. coli* tüved säilitati -80°C juures Tartu Ülikooli arstiteaduskonna mikrobioloogia instituudi Inimese Mikrobiota Biopangas (HUMB) säilitusvuaalides ja skim milk (Neogen, Saksamaa) söötmes edaspidisteks bakterioloogilisteks ja molekulaarseteks uuringuteks.

#### 2.2.1. *E. coli* identifitseerimine

Uuringusse valitud tüvede liigiline kuuluvus identifitseeriti Tartu Ülikooli mikrobioloogia instituudis kasutades MALDI-TOF analüsaatorit (Bruker Daltonics GmbH, Saksamaa). Tüved külvati mitteselektiivsele veriagarile (Oxoid) ja inkubeeriti ööpäev temperatuuril 37°C. MALDI-TOF-i kasutati vastavalt tootja protokollile.

#### 2.2.2. ESBL fenotüübi määramine

##### 2.2.2.1. ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub>

Kohalikes laborites teostati *E. coli* de ESBL skriining ja kinnitustestid ning seejärel saadeti tüved TÜ mikrobioloogia instituuti. *E. coli* vähenenud antibiootikum-tundlikkus tuvastati lähtudes EUCAST

(2.0) (Balti riigid) ja CLSI (2011) (Venemaa) kriteeriumidest. ESBL produktsiooni kinnitamiseks kasutati diskide meetodil põhinevat ESBL määramis komplekti (ESBL ja AmpC Confirm kit) (Rosco, Taani).

ESBL<sub>A</sub> tootmise kinnitamiseks kasutati järgnevaid diske: tsefotaksiim (CTX), tsefotaksiim + klavulaanhape (CTX-C), tseftasidiim (CAZ), tseftasidiim + klavulaanhape (CAZ-C). ESBL<sub>M</sub> olemasolu kindlakstegemiseks kasutati tsefotaksiimi, tseftasidiimi, tsefotaksiim + kloksatsilliini (CTX-CX) ning tseftasidiimi + kloksatsilliiniga (CAZ-CX) immutatud diske.

Tsefotaksiim ja tseftasidiim on tsefalosporiinid, millele ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>M-C</sub> produtseerijad on resistentsed. Klavulaanhape on ESBL<sub>A</sub> inhibiitor ning kloksatsilliin ESBL<sub>M-C</sub> inhibiitor (Bush *et* Jacoby, 2010).

Mikroobid külvati veriagarile ning kasvatati üleöö 37°C juures. Agarsöötmele kasvanud mikroobikultuurist tehti steriilses füsioloogilise lahuses 0.5 McFarlandi tihedusega suspensioon ning plaaditi Mueller Hinton agarile. Antibiootikumidega immutatud diskid asetati agarile: (CTX 30 µg, CTX 30 µg + C, CTX 30 µg + CX, CAZ 30 µg, CAZ 30 µg + C, CAZ 30 µg + CX) ning inkubeeriti üleöö 37°C juures. Seejärel mõõdeti diskide ümber kasvuvabade tsoonide diameetrid. Kui CTX-C ning CTX ja/või CAZ-C ning CAZ diskide ümber tekkinud kasvuvaba tsooni diameetrite erinevus oli 5 mm või suurem, loeti tüvi ESBL<sub>A</sub> positiivseks. Kui CTX-CX ning CTX ja/või CAZ-CX ning CAZ diskide ümber tekkinud kasvuvaba tsooni diameetrite erinevus oli 5 mm või suurem, oli tegu ESBL<sub>M</sub> positiivse tüvega. Kui vähemalt ühe diskide kombinatsiooniga tuvastati vähenenud tundlikkus, loeti tüvi vastavalt ESBL<sub>A</sub> või ESBL<sub>M</sub> positiivseks.

### **2.2.3. Genotüübiline ESBL määramine**

#### **2.2.3.1. DNA eraldamine**

Kõik isoleeritud tüved külvati säilitussöötmele mitte-selektiivsele veriagarile ja inkubeeriti 1 ööpäev temperatuuril 37°C. Bakterikultuurist DNA eraldamiseks kasutati keetmismeetodit. Veriagarilt eemaldati külviaasaga 2 keskmise suurusega kolooniat. Kolooniad viidi külviaasaga PCR tuubi, mis sisaldas 100 µl MilliQ vett. Tuubid asetati PCR masinasse 98°C juurde 15 minutiks, et rakud lõhkuda. Peale kuumutamist tsentrifugeeriti tekkinud rakusade tuubi põhja (fuug Eppendorf 5810R, Saksamaa), seejärel eemaldati supernatant. DNA kontsentratsioonid ühtlustati lahjenduste abil (10-20 ng/µl), kasutades NanoDrop (Thermo Scientific), süsteemi. DNA-d säilitati -20°C juures edaspidisteks molekulaarseteks uuringuteks.

#### **2.2.3.2. ESBL<sub>A</sub> *bla*<sub>SHV</sub> geeni identifitseerimine PCR meetodil**

Klassikalise PCR meetodi abil tuvastati *bla*<sub>SHV</sub> geeni järgnevaid variante (1, -2, -5, -7, -11, -12, -18, -26, -32, -33, -38, -44, -46, -49) (Ramazanzadeh, 2010). Täpse *bla*<sub>SHV</sub> variandi määramiseks on vajalik järjestuse sekveneerimine. Reaktsioonis kasutati 1 µl keedetud DNA lüsaati. PCR-i reaktsiooni maht

oli 10 µl, mis sisaldas: Maxima Hot Start Green PCR Master Mix 5 µl (Maxima Hot Start Taq DNA polümeraas, 2x hot Strart PCR puhver, 0,4 mM igat dNTP-d, 4 mM Mg<sup>2+</sup>) (Thermo Scientific), mõlemat praimerit 0,7µl (10 µM). Amplifikatsioon teostati firma Eppendorf aparaadiga Mastercycler personal (Saksamaa). Amplifitseeritud järjestuse pikkus 982 bp. Kasutatud PCR praimerite järjestused toodud tabelis 3 ja PCR programm tabelis 4. Positiivsed kontrollid pärinesid Rootsi infektsioonhaiguste referentsinstituudist (Smittskyddsinstitutet), Stockholm-ist.

Geeni *bla<sub>SHV</sub>* olemasolu ja pikkust kontrolliti geelelektroforeesil kasutades Bio-Rad Laboratoris power pac 300 elektroforeesimasinat. Võrdlusena kasutati DNA fragmentide pikkuse määramiseks suurusmarkerit O`Range Ruler 100 bp DNA Ladder (0,05 µg/µl) (Fermentas, Leedu). PCR-i produktid kanti 1,5%-lisele etiidiumbromiidi (0,05 µg/ml) sisaldavale horisontaalsele agarosgeelile, 1x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,5 (Naxo)). Visualiseerimiseks kasutati Syngene visualiseerimisaparatuuri ning GeneSnap tarkvara (Syngene).

**Tabel 3.** Kasutatud praimerid geeni *bla<sub>SHV</sub>* identifitseerimiseks (Ramazanzadeh, 2010)

Geen	Praimer	Praimeri järjestus (5`-3`)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F	GGGTTATTCTTATTTGTTCG
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC

**Tabel 4.** PCR programm geeni *bla<sub>SHV</sub>* identifitseerimiseks (Ramazanzadeh, 2010)

Protsess	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Esialgne denaturatsioon	95°C	10 min	35
Denaturatsioon	95°C	5 s	
Praimerite seostumine	60°C	40 s	
DNA süntees	72°C	10 s	

### 2.2.3.3. ESBL<sub>A</sub> CTX-M klastrite määramine real-time PCR meetodi abil

Spetsiaalsete praimerite paari abil amplifitseeriti DNA fragment, mis oli kõigis CTX-M-i kodeerivates järjestustes. Neli erinevat Taqman (IDT, Rootsi) fluorofor märgisega indikaatorit (ing k., *probe*) kaasati reaktsiooni, mis spetsiifiliselt seondusid amplifitseeritud järjestustega (Birkett *et al.*, 2007). Kasutatud *probe*-id ja real-time PCR programm tabelis 5 ja tabelis 6. Kolm *probe*-i (Joe, Cy5, Rox märgisega) detekteerisid spetsiifiliselt geene, mis kodeerisid CTX-M-1, CTX-M-2 ja CTX-M-9 grupi ensüüme; neljas *probe* (Fam märgisega) detekteeris CTX-M genotüüpe klastrist CTX-M-8/-25. Reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl, mis sisaldas 1x qPCR Mastermix No Rox puhvrit 12,5µl (dNTP (dUTP), HotGoldStar DNA polümeraasi, 5mM MgCl, uratsiil-N-glükosülaasi, stabilisaatoreid (Eurogentec, Belgia), 5 µM igat *probe*-i, 10 µM praimerite segu (Thermo Scientific). Reaktsioonis kasutati matriitsina 5 µl bakterilüsaati. Denaturatsioon, praimerite seostumine ja DNA süntees toimusid termotsüklis Applied Biosystems (ABI) 7500. DNA fragmentide hulk ja spetsiifilise indikaatori seandumine amplifitseeritud PCR produktiga suurenes eksponentsiaalselt ning tekkinud

fluorestsentsignaali mõõdeti ja visualiseeriti graafikul. Erinevad fluoroformärgisega *probid* neelasid valgust eri lainepikkustel ning see võimaldas tuvastada CTX-M klastrid. Positiivsed kontrollid pärinesid Rootsi infektsioonhaiguste referentsinstituudist (Smittskyddsinstitutet), Stockholmist.

**Tabel 5.** CTX-M klastrite real-time PCR-is kasutatud praimerid ja *probe*-id (Birkett *et al.*, 2007)

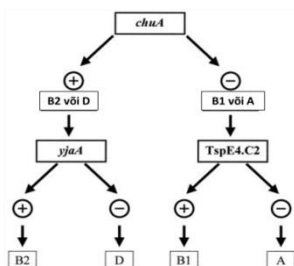
Praimer/probe	Nukleotiidi järjestus
(Forward) CTX-M praimer	5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC-3'
(Reverse) CTX-M praimer	5'-ATC ACK CGG RTC GCC XGG RAT-3'
CTX-M-1 klasteri <i>probe</i>	5'-Joe-CCC GAC AGC TGG GAG ACG AAA CGT-BHQ1-3'
CTX-M-2 klasteri <i>probe</i>	5'- Cy5-CAG GTG CTT ATC GCT CTC GCT CTG TT-BHQ-3-3'
CTX-M-9 klasteri <i>probe</i>	5'-Rox-CTG GAT CGC ACT GAA CCT ACG CTG A-BHQ-2-3'
CTX-M klasteri <i>probe</i> , mis on spetsiifiline kõigile CTX-M klasteritele v.a. CTX-M-1	5'-6-Fam-CGA CAA TAC NGC CAT GAA-MGB-NFQ-3'

**Tabel 6.** CTX-M klastrite real-time PCR programm (Birkett *et al.*, 2007)

Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
1. 50 °C	2 min	40 tsüklit
2. 95 °C	10 min	
3. 95 °C	10 s	
4. 58 °C	1 min	

#### 2.2.3.4. *E. coli* fülogeneetilise grupi määramine

Klassikalise PCR meetodi abil (Clermont *et al.*, 2000) määrati *E. coli* tüvede fülogeneetiline kuuluvus gruppidesse A, B1, B2 ja D. Meetod põhineb kolme geeni *chuA*, *yjaA* ja *TspE4.C2* kombinatsiooni olemasolul (Joonis 4).



**Joonis 4.** Clermont *et al.* (2000) fülogeneetiliste gruppide määramine geenide olemasolul/puudumisel.



### 2.2.3.5. *E. coli* klooni ST131 O25:H4 identifitseerimine PCR *pabB* meetod

*PabB* alleel-spetsiifilise meetodiga määrati *E. coli* kloon ST131 O25:H4. Clermont *et al.* (2009) meetod põhineb polümorfismi tuvastamisel *pabB* geenis (tümiin-144 ja adeniin-450), mis on spetsiifiline ST131-le (Clermont *et al.*, 2009). Praimerid amplifitseerisid 347 bp suuruse fragmendi *pabB* geenist (Tabel 7). Lisaks kasutati positiivset kontroll PCR-i, et vältida praimerite seostumisest tulenevaid vigu. Kontroll PCR amplifitseeris 427 bp suuruse fragmendi *trpA* geenist. Positiivne kontroll pärines Rootsi infektsioonhaiguste referentsinstituudist (Smittskyddsinstitutet), Stockholmist. PCR reaktsiooni maht oli 20 µl, mis sisaldas: 2 µl 10 x puhvrit (Taq polümeraasiga), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol *Pab* primereid, 12 pmol *trpA* primereid, 2µM dNTP, 1 U Taq polümeraasi. Bakterilüsaati lisati 3 µl. Positiivseks loeti proov, millel olid mõlemad PCR produktid. PCR programm toodud tabelis 8. Elektroforeesil kasutati Bio-Rad power pac 300 masinat 150V, 400 mA juures. Kasutati agarosgeeli (2%), mis oli tehtud TAE puhvrist (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,5 (Naxo) ning sisaldas etiidumbromiidi 0,5 µg/ml. Geenifragmendid visualiseeriti UV-s, kasutati Syngene visualiseerimisaparatuuri ning GeneSnap tarkvara (Syngene).

**Tabel 7.** Kasutatud praimerid PCR *pabB* meetodis (Clermont *et al.*, 2009)

Geen	Praimer	Praimeri järjestus (5'-3')
<i>pabB</i>	O25pabBspe.F	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT
	O25pabBspe.R	GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT
<i>trpA</i>	trpA.F	GCTACGAATCTCTGTTTGCC
	trpA2.R	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG

**Tabel 8.** PCR programm *pabB* meetodis (Clermont *et al.*, 2009)

Protsess	Tsüklid	Aeg
Esialgne denaturatsioon		4 min 94°C
Denaturatsioon	30 tsüklit	5 s 94°C
Praimerite seostumine		10 s 60°C
Lõpp ekstensioon		5 min 72°C

### 2.2.3.6. Statistiline analüüs

Statistilise analüüsi läbiviimiseks kasutati veebilehte <http://www.vassarstats.net/tab2x2.html>. Gruppidevaheliste erinevuste leidmiseks kasutati  $\chi^2$ -testi ja Fisheri täpset testi (Fischer Exact test), olulisuse nivood  $\alpha=0.05$ .

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede ESBL fenotüübid ja genotüübid

#### 2.3.1.1. *E. coli* jaotus ESBL fenotüübi järgi

Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) haiglates skriinitud  $\beta$ -laktaam antibiootikumide tundlikkust kliinilistest materjalidest isoleeritud 7774 *E. coli* tüvel. Vähenenud tundlikkus  $\beta$ -laktaam antibiootikumide suhtes tuvastati 421 (5,4%) *E. coli* tüvel. Diskide meetodil põhineva kinnitustestiga oli vähenenud tundlikkus tsefotaksiimile ja/või tseftasidiimile 399 tüvel. ESBL-negatiivseid tüvesid oli 22. Kliiniliste materjalide järgi oli uriinist isoleeritud tüvesid n=244, mädaast n=93, trahhea eritisest n=37 ja verest n=25.

Giske *et al.* (2009) klassifikatsiooni süsteemist lähtudes jaotusid *E. coli* tüved (n=399) fenotüübi järgi järgnevalt: ESBL<sub>A</sub> n=297 (74%), ESBL<sub>M</sub> n=32 (8%) ja ESBL<sub>A+M</sub> n=70 (18%). Erinevad ESBL fenotüübid jaotusid sarnaselt erinevate kliiniliste materjalide vahel. ESBL-positiivsete tüvede esinemissagedus kõikide skriinitud tüvede seas (n=7774) oli 5,1%; domineerisid ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüved (3,8%) (Tabel 9).

**Tabel 9.** *E. coli* ESBLfenotüübilise skriiningu ja kinnitustesti tulemused

Skriining		Kinnitustest		ESBL-positiivsed* (%)	
<i>E. coli</i> (n)	ESBL-positiivsed (n)	ESBL-positiivsed (n)	ESBL-positiivsed n (%)		
7774	421	399	ESBL <sub>A</sub> 297 (74%) ESBL <sub>M</sub> 32 (8%) ESBL <sub>A+M</sub> 70 (18%)	5,1%	ESBL <sub>A</sub> 3,8% ESBL <sub>M</sub> 0,4% ESBL <sub>A+M</sub> 0,9%

\* Giske *et al.* (2009) klassifikatsioon

#### 2.3.1.2. *E. coli* tüvedel ESBL<sub>A</sub> geenide jaotus

ESBL-positiivsetes *E. coli* tüvedes (n=399) identifitseeriti ESBL<sub>A</sub> geenid *bla*<sub>SHV</sub> ja CTX-M. Real-time PCR meetodil tuvastati CTX-M geen ja selle klastrid (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8/25) 342 (86%) *E. coli* tüves (Tabel 10). CTX-M klastritest esines kõige sagedamini CTX-M-1 283 (71%) tüvel, seejärel CTX-M-9 56 (14%) tüvel. Vähe oli klastrisse CTX-M-2 kuuluvat geeni, mida leiti ainult kahel ning CTX-M-8/25 klastrite geeni, mida leiti ühel tüvel. CTX-M geen puudus 57 (14%) tüvel. Ühelgi tüvel ei olnud mitut erinevasse CTX-M klastrisse kuuluvat geeni. Klassikalise PCR meetodiga tuvastati geen *bla*<sub>SHV</sub> 65 (16%) *E. coli* tüves. Nendest 65 tüvest oli *bla*<sub>SHV</sub> geen üksinda seitsmes (2%) *E. coli* tüves ja koos CTX-M geeniga 58 tüves (14%). Mitte kumbagi uuritud ESBL<sub>A</sub> geeni ei olnud 50 (12%) tüvel.

Võrreldi ka *bla<sub>SHV</sub>* ja *bla<sub>CTX-M</sub>* geenide esinemist erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvedel, kuid statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

**Tabel 10.** *E. coli* tüvede (n=399) ESBL<sub>A</sub> geenide esinemissagedused: CTX-M klastrite jaotus; *bla<sub>SHV</sub>* geeni jaotus; CTX-M klastrid koos *bla<sub>SHV</sub>* geeniga

ESBL <sub>A</sub> geenid		ESBL <sub>A</sub> geenide n (%)
CTX-M klastrid	CTX-M-1	283 (71)
	CTX-M-2	2 (0,5)
	CTX-M-9	56 (14)
	CTX-M-8/25	1 (0,2)
	CTX-Mneg	57 (14)
<i>bla<sub>SHV</sub></i> geen	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	65 (16)
	<i>bla<sub>SHV</sub></i> neg	334 (84)
CTX-M+ <i>bla<sub>SHV</sub></i>	ainult CTX-M	284 (71)
	ainult <i>bla<sub>SHV</sub></i>	7 (2)
	<i>bla<sub>SHV</sub></i> +CTX-M	58 (15)
	ESBL <sub>A</sub> neg	50 (12)

### 2.3.1.3. ESBL: genotüübiline ja fenotüübiline võrdlus

ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga *E. coli* tüvedest oli CTX-M geeniga 95% (n=282/297): domineeris klasteri CTX-M-1 geen, 83% (n=248/297); klasteri CTX-M-9 geen oli olemas 11% (n=32/297); CTX-M geen puudus 5% (n=15/297) tüvedest (Tabel 11). ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvedest kandis CTX-M geeni kokku 12% (n=4/32), esindatud oli nii CTX-M-1 klaster kui ka CTX-M-9. Mõlema fenotüübiga (ESBL<sub>A+M</sub>) tüvedes oli CTX-M geeni 80% (n=56/70) tüvedest: 46% (n=32/70) CTX-M-1 klasteri geeni ja 33% (n=23/70) CTX-M-9. ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüvedes oli CTX-M-1 klasteri geen sagedamini kui ESBL<sub>M</sub> või ESBL<sub>A+M</sub> tüvedes (p<0.0001; p<0.0001). ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes oli CTX-M-9 klasteri geen sagedamini kui ainult ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüvedes (p<0.0001). ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvedes puudus CTX-M geen võrreldes ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes (p<0.0001; p=0.0002).

ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga *E. coli* tüvedes oli *bla<sub>SHV</sub>* geen 15% (n=44/297) olemas. ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvedest (n=32) kandis *bla<sub>SHV</sub>* geeni ainult üks tüvi. ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes oli antud geen olemas 29% tüvedest (n=20/70). ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes oli *bla<sub>SHV</sub>* geen sagedamini olemas kui ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvedes (p=0.008; p=0.002). ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüvedes oli ainult CTX-M geen olemas sagedamini kui ESBL<sub>M</sub> ja ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes (p<0.0001; p<0.0001). ESBL<sub>A+M</sub> tüvedes oli ainult CTX-M geen sagedamini kui ESBL<sub>M</sub> tüvedes (p<0.0001). ESBL<sub>A+M</sub> tüvedes oli *bla<sub>SHV</sub>* koos CTX-M geeniga sagedamini kui ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvedes

( $p=0.008$ ;  $p=0.001$ ).  $ESBL_M$  fenotüübiga tüvesid oli  $ESBL_A$  geenideta sagedamini kui  $ESBL_A$  ja  $ESBL_{A+M}$  tüvesid ( $p<0.0001$ ;  $p<0.0001$ ).  $ESBL_A$  fenotüübiga tüvede seas oli vähem  $ESBL_A$  geenideta tüvesid kui  $ESBL_{A+M}$  tüvede seas ( $P=0.0002$ ) (Tabel 11).

**Tabel 11.** Erinevate ESBL fenotüüpidega *E. coli* tüvedes ( $n=399$ )  $ESBL_A$  geenide jaotused: CTX-M klastrid;  $bla_{SHV}$  geen; CTX-M ja  $bla_{SHV}$  koos

ESBL <sub>A</sub> genotüübid	ESBL fenotüübid n (%)		
	ESBL <sub>A</sub> (n=297)	ESBL <sub>M</sub> (n=32)	ESBL <sub>A+M</sub> (n=70)
CTX-M-1	248 (83) <sup>1,2</sup>	3 (9) <sup>1</sup>	32 (46) <sup>2</sup>
CTX-M-2	1 (0,3)	0 (0)	1(1)
CTX-M-8/25	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)
CTX-M-9	32 (11) <sup>3</sup>	1 (3)	23 (33) <sup>3</sup>
CTX-Mneg	15 (5) <sup>4</sup>	28 (88) <sup>4,5</sup>	14 (20) <sup>5</sup>
$bla_{SHV}$	44 (15) <sup>6</sup>	1 (3) <sup>7</sup>	20 (29) <sup>6,7</sup>
$bla_{SHVneg}$	253 (85)	31 (97)	50 (71)
ainult CTX-M	251 (85) <sup>8,9</sup>	1 (3) <sup>8,10</sup>	38 (54) <sup>9,10</sup>
ainult $bla_{SHV}$	4 (1)	1 (3)	2 (3)
$bla_{SHV}+CTX-M$	31 (10) <sup>11</sup>	3 (9) <sup>12</sup>	18 (26) <sup>11,12</sup>
ESBL <sub>A</sub> neg	11 (4) <sup>13,15</sup>	27 (85) <sup>13,14</sup>	12 (17) <sup>14,15</sup>

<sup>1</sup> $p<0.0001$ ; <sup>2</sup> $p<0.0001$ ; <sup>3</sup> $p<0.0001$ ; <sup>4</sup> $p<0.0001$ ; <sup>5</sup> $p=0.0002$ ; <sup>6</sup> $p=0.008$ ; <sup>7</sup> $p=0.002$ ; <sup>8</sup> $p<0.0001$ ; <sup>9</sup> $p<0.0001$ ; <sup>10</sup> $p<0.0001$ ; <sup>11</sup> $p=0.008$ ; <sup>12</sup> $p=0.001$ ; <sup>13</sup> $p<0.0001$ ; <sup>14</sup> $p<0.0001$ ; <sup>15</sup> $p=0.0002$ .

#### 2.3.1.4. *E. coli* fülogeneetiline kuuluvus ja seos $ESBL_A$ geenidega

ESBL-postitiivsed *E. coli* tüved jaotusid Clermont *et al.* (2000) multiplex-PCR meetodi järgi erinevatesse fülogeneetilistesse gruppidesse järgnevalt: fülogeneetilisse gruppi A kuulus 25 tüve (6%), gruppi B1 15 (4%), gruppi B2 281 (70%) ja grupp D 78 (20%) (Tabel 12).

Gruppi A ja B1 kuuluvatel *E. coli* del oli CTX-M-1 klstri geeni vastavalt 84% ja 87% ( $n=21/25$ ,  $n=13/15$ ), B2 grupil 72% ( $n=203/281$ ), D grupil 59% ( $n=46/78$ ). D grupi tüvedes oli CTX-M-1 klstri geeni harvemini kui A, B1, B2 grupi tüves ( $p=0.02$ ;  $p=0.04$ ;  $p=0.02$ ) (Tabel 12). Klstri CTX-M-9 geeni gruppidesse A ja B1 kuuluvates tüvedes ei leitud. Seevastu oli selle klstri geen levinud fülogrupi D 23% ( $n=18/78$ ) ja B2 tüvedes 14% ( $n=38/281$ ). D grupi tüvedes oli CTX-M-9 klstri geene sagedamini kui A ja B1 grupi tüves ( $p=0.005$ ;  $p=0.03$ ). Ka oli D fülogrupis lisaks CTX-M-1 ja CTX-M-9 klstri geeniga tüvedele kaks CTX-M-2 ja üks CTX-M-8/25 klstri geeniga tüve. CTX-M geenita tüvesid oli erinevatesse fülogrupidesse jaotunud sarnaselt, ligi 1/5 (Tabel 12). Kõige enam oli  $bla_{SHV}$  olemas B1 grupi tüvedel (27%) ja kõige vähem B2 grupi tüvedel (14%), statistiliselt olulist erinevust ei leitud (Tabel 12).

**Tabel 12.** Erinevatesse fülogruppidesse kuuluvate *E. coli* tüvede (n=399) ESBL<sub>A</sub> geenide jaotus: CTX-M ja bla<sub>SHV</sub> geenid

ESBL <sub>A</sub> geenid	Fülogrupid n (%)			
	A (n=25)	B1 (n=15)	B2 (n=281)	D (n=78)
<b>CTX-M-1</b>	21 (84) <sup>1</sup>	13 (87) <sup>2</sup>	203 (72) <sup>3</sup>	46 (59) <sup>1,2,3</sup>
<b>CTX-M-2</b>	0	0	0	2 (3)
<b>CTX-M-8/25</b>	0	0	0	1 (1)
<b>CTX-M-9</b>	0 <sup>4</sup>	0 <sup>5</sup>	38 (14)	18 (23) <sup>4,5</sup>
<b>neg</b>	4 (16)	2 (13)	40 (14)	11 (14)
<b>bla<sub>SHV</sub></b>	5 (20)	4 (27)	40 (14)	16 (21)
<b>bla<sub>SHV</sub>neg</b>	20 (80)	11 (73)	241 (86)	62 (79)

<sup>1</sup>p=0.02; <sup>2</sup>p=0.04; <sup>3</sup>p=0.02; <sup>4</sup>p=0.005; <sup>5</sup>p=0.03.

### 2.3.1.5. *E. coli* kloon ST131-O25:H4 esinemissagedus ja seos ESBL<sub>A</sub> geenidega

Klassikalise PCR-meetodiga skriiniti fülogeneetilise grupi B2 tüvede (n=281) seast *E. coli* klooni ST131-O25:H4 (Tabel 13). B2 fülogruppi kuuluvate tüvede seas oli *E. coli* klooni ST131 levimus kõrge, 83% (n=234/281). Võrreldi klooni ST131 ja mitte-klooni ESBL<sub>A</sub> geenide jaotust ning leiti, et mõlemas domineeris CTX-M-1 klaster ning vähem oli CTX-M-9 klasteri gene. ST131 seas oli bla<sub>SHV</sub> geeniga tüvesid rohkem kui mitte-ST131 seas (16% vs 6%). Statistiliselt olulisi erinevusi kloon ST131 ja mitte-ST131 ESBL<sub>A</sub> geenide jaotumises ei tuvastatud. Kloon ST131 esines kõikide ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede hulgas 59% (n=234/399)

**Tabel 13.** *E. coli* kloon ST131 O25:H4 ja ESBL<sub>A</sub> geenide jaotus

<i>E. coli</i> fülogrupp B2		
ESBL <sub>A</sub> geenid	ST131 (n=234) n (%)	mitte-ST131 (n=47) n (%)
<b>CTX-M-1</b>	170 (73)	33 (70)
<b>CTX-M-9</b>	33 (14)	5 (11)
<b>CTX-Mneg</b>	31 (13)	9 (19)
<b>bla<sub>SHV</sub></b>	37 (16)	3 (6)
<b>bla<sub>SHV</sub>neg</b>	197 (84)	44 (94)

## 2.3.2. ESBL<sub>A</sub> epidemioloogia

### 2.3.2.1. Erinevatest riikidest isoleeritud *E. coli* tüvede ESBL<sub>A</sub> geenide jaotus

Võrreldi Eestist, Lätist, Leedust ja Venemaalt isoleeritud *E. coli* tüvedes (n=399) ESBL<sub>A</sub> geenide (*bla*<sub>SHV</sub> ja CTX-M) esinemissagedusi (Tabel 14). Lätis isoleeritud tüvedest omasid CTX-M-1 klasteri geeni 88% (n=98/112), Venemaal 73% (n=98/134), Eestis 61% (n=72/118) ja Leedus 43% (n=15/35). CTX-M-1 klasteri geeni on Läti tüvede seas statistiliselt rohkem kui Eesti, Leedu ja Venemaa tüvedes (p<0.0001; p<0.0001; p=0.006) ning Venemaa tüvedes sagedamini kui Leedu tüvedes (p=0.001). CTX-M-9 klasteri geen esines kõige sagedamini Leedu tüvedes, 26% (n=9/35), seejärel Venemaa tüvedes, 18% (n=24/134), vähem Eesti ja Läti tüvedes, vastavalt 14% ja 6% (n=16/118; n=7/112). CTX-M-9 klasteri geene on Leedu tüvede seas statistiliselt enam kui Läti ja Eesti tüvedes (p=0.003; p=0.001). Klasteri CTX-M-2 geene oli ühes Leedu ja ühes Venemaa tüves ning klasteri CTX-M-8/25 geeni leiti ainult ühes Venemaa tüves. CTX-M negatiivseid tüvesid oli kõige enam Leedus, 28% (n=10/35) ja kõige vähem Lätis, 6% (n=7/112). Leedust ja Eestist isoleeritud tüved olid sagedamini CTX-M negatiivsed võrreldes Lätist (p=0.0007; p<0.0001) ja Venemaalt (p=0.001; p=0.0001) isoleeritud *E. coli* tüvedega.

Läti, Leedu ja Venemaa *E. coli* des identifitseeriti *bla*<sub>SHV</sub> ligi 1/5 tüvedes. Vähem tuvastati *bla*<sub>SHV</sub> geeniga tüvesid Eestis, ainult 12% (n=14/118). Statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud (Tabel 14).

**Tabel 14.** Erinevatest riikidest isoleeritud *E. coli* tüvel (n=399) CTX-M ja *bla*<sub>SHV</sub> esinemissagedused

ESBL <sub>A</sub> geenid	Eesti (n=118)	Läti (n=112)	Leedu (n=35)	Venemaa (n=134)
CTX-M-1	72 (61) <sup>1</sup>	98 (88) <sup>1,2,3</sup>	15 (43) <sup>2,4</sup>	98 (73) <sup>3,4</sup>
CTX-M-2	0 (0)	0(0)	1 (3)	1 (1)
CTX-M-9	16 (14) <sup>6</sup>	7 (6) <sup>5</sup>	9 (26) <sup>5,6</sup>	24 (18)
CTX-M-8/25	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
CTX-M neg	30 (25) <sup>9,10</sup>	7 (6) <sup>7,9</sup>	10 (28) <sup>7,8</sup>	10 (7) <sup>8,10</sup>
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> -pos	14 (12)	20 (18)	7 (20)	24 (18)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> -neg	104 (88)	92 (82)	28 (80)	110 (82)

<sup>1</sup>p<0.0001; <sup>2</sup>p<0.0001; <sup>3</sup>p=0.006; <sup>4</sup>p=0.001; <sup>5</sup>p=0.003; <sup>6</sup>p=0.001; <sup>7</sup>p=0.0007; <sup>8</sup>p=0.001; <sup>9</sup>p<0.0001; <sup>10</sup>p=0.0001.

### 2.3.2.2. Erinevatest riikidest isoleeritud tüvede seas *E. coli* klooni ST131-O25:H4 esinemissagedus

Võrreldi klooni ST131-O25:H4 (n=281) esinemissagedusi Eesti (n=97), Läti (n=100), Leedu (n=22) ja Venemaa (n=62) B2 fülogrupi tüvede seas. Läti, Eesti ja Leedu B2 fülogrupi tüvedest moodustas

kloon ST131 81% (81/100), 88% (85/97) ja 95% (21/22). ST131 tuvastati vähem Venemaa B2 tüvede hulgas, 76% (47/62), kuid leitud erinevus ei olnud statistiliselt oluline.

Seejärel vaadati ST131 esinemissagedust kõikide tüvede seas (n=399) (Tabel 15). ESBL-positiivsete tüvede (n=399) seas oli ST131 esinemissagedus 59%: Eestis 72%, Lätis 72%, Leedus 60% ja Venemaal 35% (Tabel 16). *E. coli* ST131 kloon oli vähem levinud Venemaal võrreldes Eestist, Lätist ja Leedust isoleeritud tüvedega (P<0.0001; P<0.0001; P=0.01).

**Tabel 15.** *E. coli* kloon ST131-O25:H4 esinemissagedused erinevates riikides

<b>ESBL <i>E. coli</i> (n=399)</b>		
<b>Riigid (n)</b>	<b>ST131 n (%)</b>	<b>mitte-ST131 n (%)</b>
<b>Eesti</b> (n=118)	85 (72) <sup>1</sup>	33 (28)
<b>Läti</b> (n=112)	81 (72) <sup>2</sup>	31 (28)
<b>Leedu</b> (n=35)	21 (60) <sup>3</sup>	14 (40)
<b>Venemaa</b> (n=134)	47 (35) <sup>1,2,3</sup>	87 (65)

<sup>1</sup>p<0.0001; <sup>2</sup>p<0.0001; <sup>3</sup>p=0.01.

## 2.4. Arutelu

Viimasel kümnendil on infektsioone põhjustavate kliiniliste isolaatide seas resistentsete *E. coli* tüvede osakaal pidevalt suurenenud. See on seotud laiendatud toimespektriga  $\beta$ -laktamaaside (ESBL) produktsiooniga, mis inaktiveerivad raviks kasutatavad  $\beta$ -laktaam antibiootikumid: penitsilliinid, 3. ja 4. põlvkonna tsefalosporiinid ning monobaktaamid (ECDC, 2013; Gibold *et al.*, 2014; Novais *et al.*, 2007). Beeta-laktaam antibiootikumid on bakteritsiidse toimega ained, mille vastu on bakteritel võitlemiseks mitmeid erinevaid mehhanisme. Üheks olulisemaks on ensüümi  $\beta$ -laktamaasi produktsioon, mis lõhub antibiootikumi  $\beta$ -laktaam ringi. ESBL-e produtseerivad tüved on globaalselt levinud ning seda seostatakse resistentsusgeenide horisontaalse liikidevahelise (palsmiidid, integronid jne) ja vertikaalse ülekandega (fülogeneetiline kuuluvus ja kloon). Kirjanduses puuduvad andmed ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede levikust, feno- ja genotüübilisest jaotusest Balti mere piirkonnas.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli võrrelda fenotüübilisi ja genotüübilisi meetodkaid  $\beta$ -laktamaasi produtseerivate tüvede kindlakstegemiseks ning ESBL<sub>A</sub> geenide seos fülogeneetilise kuuluvusega ja nende epidemioloogia Balti mere piirkonnas. Fenotüübiliste meetoditega skriiniti kokku 7774 *E. coli* tüve, millest üle 5% osutsusid ESBL positiivseteks. ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede seas domineerisid ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüved ning vähem oli ESBL<sub>A+M</sub> ja ainult ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvesid. Fenotüübiline ESBL<sub>A</sub> on põhjustatud ESBL<sub>A</sub> klassi kuuluvate CTX-M, SHV ja TEM ensüümide poolt ning ESBL<sub>M</sub> fenotüüp AmpC poolt (Giske *et al.*, 2009). ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüved on kõige enam levinud kogu maailmas (Gibold *et al.*, 2014; Mockracka *et al.*, 2013). ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga tüvede esinemissagedused kliiniliste tüvede seas on pigem madalad (Starlander *et al.*, 2014; Reuland *et al.*, 2014). Starlander *et al.* (2014) on võrrelnud ESBL<sub>A</sub> ja ESBL<sub>M</sub> tüvesid ning leidnud, et ESBL<sub>A</sub> tüved on virulentsemad, laia resistentsusprofiiliga ning tunduvalt pikema vastupidavusega keskkonnas kui ESBL<sub>M</sub> tüved. Tõenäoliselt oli see ka üheks võimalikuks põhjuseks, miks ESBL<sub>A</sub> tüved ka antud töö materjalides kõrge esinemissagedusega olid.

*Bla*<sub>SHV</sub> geene detekteeriti 16%-il tüvedest, kasutades klassikalist PCR meetodit. Antud meetodiga ei saanud eristada laia-spektriga *bla*<sub>SHV</sub>  $\beta$ -laktamaasi ESBL-idest. Geeni *bla*<sub>SHV</sub> täpseks identifitseerimiseks on vajalik sekveneerimine. Siiski annavad saadud tulemused ülevaate geeni levikust kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvedes. Varasemates uuringutes on *bla*<sub>SHV</sub> geeni esinemissagedus olnud suurem *K. pneumoniae* tüvedes ning suhteliselt madal *E. coli* tüvedes (Trang *et al.*, 2013). Kui võrrelda antud töö *bla*<sub>SHV</sub> geeni tulemusi teiste varem läbi viidud uuringutega (Huemer *et al.*, 2011), siis oli *bla*<sub>SHV</sub> geeni sagedus kõrge. Siiski ei ole antud töö tulemus erandlik. Näiteks Prantsusmaal Nicolas-Chanoine *et al.* poolt (2013) läbi viidud uuringus leiti, et *bla*<sub>SHV</sub> geen oli olemas 12%-il uuritud *E. coli* tüvedes, mis on korrelatsioonis antud töö tulemustega.

Fenotüübi järgi ESBL-positiivsetes tüvedes oli CTX-M geeni esinemissagedus kõrge (86%). Uuritud CTX-M klastritest domineerisid CTX-M-1 (71%), seejärel CTX-M-9 (14%). Onnberg *et al.* (2011) poolt läbi viidud uuringus leiti, et CTX-M geen oli 87%-il uuritud ESBL-positiivsetel enterobakteritel



ning sarnaselt antud tööga oli suurem osa tüvedest CTX-M-1 klasteri geenidega. Seejuures oli CTX-M-9 geeni klasteriga tüvede osakaal suurem kui käesolevas töös (34% vs 14%). Lisaks on paljudes teistest varasemates ESBL-tüvede uuringutes täheldatud peamiselt CTX-M-1 ja CTX-M-9 klasteri gene (Novais *et al.*, 2007; Gibold *et al.*, 2014; Markovska *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013). Teised CTX-M klasterid nagu CTX-M-8/25 ja CTX-M-2 olid *E. coli* des esindatud mõnes üksikus tüves, sarnane tulemus on saadud ka teistes uuringutes (Onnberg *et al.*, 2011; Huemer *et al.*, 2011). Ühes tüves võib esindatud olla ka mitu erinevat CTX-M klasteri geeni, kuid antud töös ühtegi sellist tüve ei identifitseeritud (Brolund *et al.*, 2013). Osades ESBL fenotüübiga tüvedes (13%) ei leitud kumbagi uuritud ESBL<sub>A</sub> geeni, mis tähendab, et ilmselt oli nendes *E. coli* des olemas mõni teine antibiootikumi resistentsusmehhanism või ESBL geen, mis vastava fenotüübi tekitasid.

Kirjanduse järgi võib CTX-M geenide kõrge esinemissagedus olla seotud tüvede vahelise horisontaalse geeni ülekandega ja klonaalne levikuga (Onnberg *et al.*, 2011). Ka on CTX-M geenide puhul leitud, et nende globaalne levik on seotud kindlate plasmiididega (Markovska *et al.*, 2013; Trang *et al.*, 2013). Kliinilises praktikas on  $\beta$ -laktaamidest tseftasidiim ja tsefotaksiim sageli kasutatavad ravimid ning ka see võib olla CTX-M geeniga tüvede selektsiooni põhjuseks.

Tüvede fenotüübilisel ja genotüübilisel võrdlemisel leiti, et enamus ESBL<sub>A</sub> fenotüübiga tüvedest oli (83%) CTX-M-1 klasteri geenidega. ESBL<sub>M</sub> ja ESBL<sub>A+M</sub> fenotüübiga tüvedes oli CTX-M-1 klasteri geeni vähem (vastavalt 9% ja 46%). ESBL<sub>A</sub> tüvede seas oli ESBL<sub>A</sub> geenita tüvesid kõige vähem (4%) ning ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga kõige rohkem (85%). *E. coli* tüvedes oli fenotüübiline ESBL<sub>A</sub> põhjustatud CTX-M-1 klasteri geenide poolt. ESBL<sub>A+M</sub> tüvedes oli lisaks CTX-M-1 klasterile rohkem tüvesid CTX-M-9 klasteri geeniga, mis on korrelatsioonis Brolund *et al.* (2013) tulemustega, kus ESBL<sub>A+M</sub> tüvedes oli samuti sagedamini esindatud mõlema klasteri geenid. Fenotüübi järgi ESBL<sub>M</sub> tüvedes oli ESBL<sub>A</sub> geenide esinemissagedused madalad ning see oli oodatav tulemus, sest fenotüübiline ESBL<sub>M</sub> on põhjustatud ESBL<sub>M</sub> klassi ensüümide poolt (AmpC).

*E. coli* teatud fülogeneetilised grupid on sagedamini seotud antibiootikum resistentsusega. Antibiootikum tundlikud tüved on peamiselt fülogeneetilises grupis B2 ning ning resistentsed tüved kuuluvad sageli gruppidesse D ja A (Cook *et al.*, 2010). Seevastu on saadud ka teistpidiseid tulemusi, kus on leitud korrelatsioon  $\beta$ -laktaam resistentsete *E. coli* tüvede ja B2 grupi vahel (Olesen *et al.*, 2013; Brolund *et al.*, 2013). Isoleeritud ESBL tüvedest kuulus suurem osa (70%) fülogruppi B2, mis langeb kokku Brolund *et al.* (2013) andmetega. Seejuures on täheldatud, et olenevalt ESBL geenist (CTX-M, SHV, TEM) on ka tüvede kuulumus fülogruppidesse erinev (Brisse *et al.*, 2012). CTX-M-1 klasteri geenidega tüved on sagedamini B2 fülogrupist ning CTX-M-9 klasteri geenidega tüved D grupist (Brisse *et al.*, 2012). Käesoleva töö tulemused erinesid: kõige enam olid CTX-M-1 klasteri geenid levinud hoopis A grupi tüvedes (84%) ja B1 grupi tüvedes (87%), mitte B2 (72%) tüvede seas. Lee *et al.* (2009) poolt tehtud uurimuse andmetel on leitud, et lisaks B2 grupile on D fülogrupi tüved positiivses korrelatsioonis CTX-M-9 klasteri geenidega. Seda väidet toetavad ka antud töö tulemused, kus CTX-M-9 klasteri geenid olid kõige enam just D fülogrupis esindatud. Seejuures CTX-M-9 klasteri

geene ei leitud A fülogrupi tüvedes. ESBL<sub>A</sub> geeni *bla*<sub>SHV</sub> esinemissagedus olid eri gruppidesse kuuluvatel tüvedel sarnased ning statistiliselt olulist erinevust ei leitud. Kõige enam oli *bla*<sub>SHV</sub> olemas D grupi tüvedel (21%) ja kõige vähem B2 grupi tüvedel (15%). CTX-M geenide suhteliselt kõrge sagedus kõikides fülogeneetilistes gruppides peegeldab ESBL-ide laialdast levikut erinevates kliinilistes tüvedes. Tulemustest võib järeldada, et fülogruppide ja ESBL<sub>A</sub> geeni tulemused on mingis osas vastavuses varasemate uuringute tulemustega, kuid esineb erinevusi.

*E. coli* O25:H4 kloon ST131 kuulub B2 fülogeneetilisse gruppi. Fülogeneetilise grupi B2 tüvede skriiningul klassikalise PCR-meetodiga leiti, et *E. coli* klooni ST131-O25:H4 levik antud tüvede seas oli kõrge, üle 83%. Sarnase tulemuse on saanud Brolund *et al.* (2013), kelle andmetel oli B2 grupi tüvedest koguni 98% *E. coli* ST131 kloon. Antud töös teisi kloone ei skriinitud, kuid kirjanduse andmetel on kliiniliste isolaatide seas levinud veel ST38, ST38, ST69, ST405, ST617, ST648 (Brolund *et al.*, 2013; Helldal *et al.*, 2013). Kirjanduse andmetel produtseerib kloon ST131 sageli klastrisse CTX-M-1 kuuluvat CTX-M-15 (Helldal *et al.*, 2013). Seevastu on viimastel aastatel avaldatud ka tulemusi, kus kloonis ST131 on leitud ka teiste CTX-M klastrite geene (Brisse *et al.*, 2012; Olesen *et al.*, 2013). Nii ST131 kui mitte-ST131 tüvedes domineerisid CTX-M-1 klastri (70% vs 73%) geenid ning vähem oli CTX-M-9 (11% vs 12%) klastri geene. Statistiliselt olulisi erinevusi kloonis ST131 ja mitte-ST131 ESBL<sub>A</sub> geenide jaotumises ei tuvastatud. Brisse *et al.* (2012) tulemused olid vastupidised, *E. coli* kloon ST131 eristus selgesti mitte-ST131 tüvedest omades sagedamini CTX-M geene kui mitte-ST131. Käesolevas töös ei sekveneeritud CTX-M klastri geene ning selle tõttu ei saa kindlalt väita, et isoleeritud ST131 tüved olid seotud CTX-M-15-ga. Siiski on alust arvata, et ilmselt on need tüved CTX-M-15 geeniga, sest kloonis ST131 domineeris CTX-M-1 klastri geen, kuhu CTX-M-15 kuulub. Klooni kõrget esinemissagedust isoleeritud tüvede seas võib seostada CTX-M-1 klastri geeni kõrge esinemissagedusega, mis annab resistentsuse  $\beta$ -laktaamide vastu. Lisaks ESBL-idele on leitud, et ST131 on sageli multiresistentne, lagundades ka teisi antibiootikumide klasse (fluorokinoloone, aminoglükosiide) (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2007; Helldal *et al.*, 2013).

Maailmas on põhjalikult uuritud  $\beta$ -laktamaasi produtseerivate bakteritüvede epidemioloogiat nii fenotüübiliste kui ka molekulaarsete markerite alusel (Brolund *et al.*, 2013; Balode *et al.*, 2013; ECDC, 2013). Epidemioloogilised andmed ESBL-positiivsete tüvede leviku kohta Eestis puuduvad ning andmed Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) kohta on kesised. Antibiootikum-resistentsuse seire andmetel oli Ida-Euroopas ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede osakaal suurim Türgis (25%) ning madalaim Leedus (3,6%) (Balode *et al.*, 2011). Meie tulemused näitasid, et Balti mere piirkonnas oli ESBL-positiivsete osakaal 5%. Madalamat ESBL-positiivsete osakaalu on täheldatud Rootsis, kus ESBL-positiivseid tüvesid oli ainult 3% (Brolund *et al.*, 2013). Eldenstein *et al.* (2013) poolt Venemaal läbi viidud uuringus oli ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede osakaal ligi 16%. Seejuures leiti, et Venemaa eri piirkondades oli ESBL-positiivsete tüvede esinemissagedused väga erinevad, varieerudes 10-90% vahel. ESBL-positiivsete esinemissagedus erinevates riikides võib olla põhjustatud suurema ja suhteliselt kontrollimatu antibiootikumide kasutamisega. Käesoleva töö

tulemuste alusel oli Balti mere piirkonnas ESBL tüvede osakaal madal sarnanedes pigem Põhja-Euroopale. See on ilmselt seotud sarnase antibiootikumide kasutus poliitikaga ja infektsioonikontrolliga.

ESBL<sub>A</sub> geenide epidemioloogia oli Balti mere riikides erinev. Baltimaades ja Venemaal oli *bla*<sub>SHV</sub> geen sarnaselt levinud (12-20%). Brolund *et al.* (2013) poolt tehtud uuringu oli *bla*<sub>SHV</sub> geenide sagedused ainult 1%-il tüvedest. Suur erinevus antud töös saadud *bla*<sub>SHV</sub> tulemustega võib tuleneda sellest, et tuvastatud *bla*<sub>SHV</sub> geenid võivad olla peamiselt kromosomaalselt kodeeritud *bla*<sub>SHV-1</sub> ja *bla*<sub>SHV-2</sub>, mis ei ole ESBL aktiivsusega. Balti mere piirkonnas domineerisid CTX-M-1 ja CTX-M-9 klastrid, mille levimus on kõrge ka teistes Euroopa riikides (Huemer *et al.*, 2011; Cicek *et al.*, 2013; Helldal *et al.*, 2013). Läti ja Venemaa tüved olid sagedamini CTX-M-1 genotüübiga võrreldes Eesti ja Leedu tüvedega (88% ja 73% versus 61% ja 43%). CTX-M-1 klasteri esinemissagedus on kooskõlas eelnevalt Lätis, Leedus ja Venemaal läbiviidud uuringutega, kus vastava klasteri esinemissagedus oli 100%, 36% ja 93% (Dumpis *et al.*, 2010; Seputiene *et al.* 2010, Eldenstein *et al.*, 2003). Venemaal leiti ka CTX-M-2 genotüübiga tüvesid (7%), mida käesoleva uuringus oli ainult ühel isolaadil. Lisaks tuvastasime 1/5 tüvedel CTX-M-9 ja ühel tüvel CTX-M-8/25 genotüübi, mida Eldenstein varasemas uuringus Venemaal ei leidnud (Eldenstein *et al.*, 2003). Viimasel kümnendil on Venemaal (Peterburg) *E. coli* de populatsioonis toimunud mõningad ESBL genotüübi muutused, mis ilmselt on mõjutatud Euroopas valitsevast olukorrast. Siiski ei ole andmete hulk piisavalt suur, et saaks teha üldistusi terve riigi kohta.

Meil puuduvad eelnevad andmed Eestist isoleeritud *E. coli* ESBL<sub>A</sub> geenide kohta. Meie töö tulemused on sarnased Rootsisis Brolund *et al.* (2013) poolt läbi viidud uuringute andmetega, kus samuti 61% ESBL-positiivsetest tüvedest oli CTX-M-1 genotüübiga. Erinevalt Eesti tüvedest oli CTX-M-9 genotüübiga tüvesid Rootsisis rohkem kui Eestis (21% vs 14%). Rootsisis identifitseeriti ka üksikud tüved CTX-M-2 genotüübiga, kuid Eestis teisi CTX-M genotüüpe ei leitud.

CTX-M-1 klasteri geenide kõrge esinemissagedus Balti mere piirkonnas on ilmselt seotud tüvedevahelise geenide ülekandega plasmiidide vahendusel. CTX-M-1 klasteri geenide ulatuslik levik erinevate konjugatiivsete plasmiididega algas peale 2000. aastat (IncN, IncL/M, IncFII). Plasmiidid IncN ning IncA/C on laia peremeesulatussega, mille tõttu võivad CTX-M geenid suure tõenäosusega edaspidi levida horisontaalsel teel ka teistesse enterobakteri liikidesse (Novais *et al.*, 2006).

*E. coli* klooni ST131-O25:H4 levikut ei ole eelnevalt Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal (Peterburg) uuritud. Tüvede fülogeneetilise kuuluvuse põhjal (70% tüvedest kuulus virulentsesse B2 gruppi) võis oletada, et ST131 on levinud ka Balti mere piirkonnas. Balti mere piirkonnast isoleeritud tüvede seas oli ST131 esinemissagedus 56%, mis on kõrgem kui varasemate uuringute andmetel Rootsisis (34%), Taanis (38%) ja Norras (20%) (Brolund *et al.*, 2013; Naseer *et al.*, 2009; Olesen *et al.*, 2013). Eestis, Lätis, Leedus oli ST131 osakaal kõrge, vastavalt 72%, 72%, 60% ning Venemaal (Peterburis) isoleeritud tüvede seas oli ST131 klooni esinemissagedus tunduvalt madalam, ainult 35%. *E. coli* klooni ST131 satatistiline erinevus Venemaa ja Balti riikide vahel võis olla tingitud *E. coli* tüvede

fülogeneetilisest kuuluvusest. Grude *et al.* (2007) on oma töös leidnud, et Venemaal isoleeritud tüvede seas esines B2 grupi tüvesid tunduvalt vähem ning selle tõttu on ilmselt Venemaal ka kloon ST131 vähem levinud. Kirjanduse andmetel on ST131 tüvedel oluliselt laiem virulentsusprofiil kui teistel ESBL-positiivsetel tüvedel ning see on üheks põhjuseks, miks kloon nii edukalt maailmas levib ja on levinud ka Balti mere piirkonnas (Olesen *et al.*, 2013).

Peale ESBL<sub>A</sub> klassi ensüümide põhjustab tsfalosporiinide resistentsust plasmiididele kodeeritud AmpC-tüüpi  $\beta$ -laktamaasid (ECDC, 2013; Brolund *et al.*, 2013). Antud töös ESBL<sub>M</sub> tüvede geene ei identifitseeritud, kuid suure tõenäosusega on tegemist ESBL<sub>M</sub> klassist AmpC-ga. AmpC on võrreldes ESBL<sub>A</sub> ensüümidega Euroopas vähem levinud, kuid USA-s on ka selle geeniga *E. coli* tüvede levimus kõrge (Munoz-Price *et al.*, 2013). Arvatakse, et lähitulevikus tekitavad enim probleeme karbapeneemi resistentsed tüved, mis kannavad erinevaid ESBL<sub>CARBA</sub> klassi kuuluvaid metallo- $\beta$ -laktamaasi geene nagu VIM ja NDM või seriin-karbapenemaase (nagu KPC). Need ensüümid annavad mikroobile resistentsuse kõikide ravimiturul olevate  $\beta$ -laktaam antibiootikumide vastu, kaasa arvatud ka karbapeneemidele ja tsefamüsiinidele (Giske *et al.*, 2009; ECDC, 2013).

Mikrobioloogilise diagnostika täiustamine ja antibakteriaalsete preparaatide kontrollitud kasutamine on oluline resistentsete bakterite leviku piiramisel. Enne antibakteriaalse ravi alustamist tuleks kindlasti määrata, kas infektsiooni põhjustaja on ravimile tundlik või mitte. Selleks, et antibakteriaalne ravi oleks efektiivsem, tuleks välja töötada praegustest kiiremad diagnoosimeetodid ning võimalusel tuleks vähendada antibiootikumide kasutamist. Molekulaarbioloogilised meetodid (PCR, sekveneerimine, kiibimeetodid) võimaldavad kiiresti tuvastada ESBL geene, kuid need meetodid on paljudele haiglalaboritele veel kättesaamatud ja kallid (Platteel *et al.*, 2011).

Käesolev uurimistöö kirjeldas kliinilistest materjalidest isoleeritud laiendatud  $\beta$ -laktamaasi produtseerivate *E. coli* de fenotüübilist ning genotüübilist jaotust, ESBL<sub>A</sub> geenide esinemissagedusi, fülogeneetilist ning klonaalset kuuluvust. Töö tulemusena leiti, et *E. coli* ESBL<sub>A</sub> fenotüüp on peamiselt põhjustatud CTX-M geenidest ning diskimeetodil ESBL<sub>A</sub> produktsiooni tuvastamine on usaldusväärne. Balti riikides ja Venemaal (Peterburg) domineerisid CTX-M-1 ja CTX-M-9 klasteri geenid, mis on sarnane tulemus varem Euroopas tehtud uuringutele. *E. coli* kloon ST131 esinemissagedus Balti riikides oli kõrgem kui kirjanduse andmetel Põhjamaades. Klooni ST131 esines oluliselt vähem Venemaa tüvedes võrreldes Balti riikidest isoleeritud tüvedega. Eestis oli ESBL tüvede kirjeldamine ning võrdlus teiste riikidega esmakordne. Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) kohta mõningad andmed olid varasematest uuringutest olemas, kuid antud töö tulemused annavad uut informatsiooni tulevaste uurimuste jaoks.

## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli kliinilistest materjalides isoleeritud laiendatud  $\beta$ -laktamaasi produtseerivate (ESBL) *E. coli* de fenotüübiliste ja genotüübiliste meetodikate võrdlus, ESBL<sub>A</sub> geenide seos fülogeneetilise kuuluvusega ja nende epidemioloogia Balti mere piirkonnas.

Baltimaades ja Venemaal (Peterburg) skriiniti kokku 7774 *E. coli* tüve. Tüvedel määrati fenotüübiliselt ESBL. Fenotüübiliselt ESBL-positiivsetel tüvedel määrati PCR-ga fülogeneetiline grupp ning PCR-ga ja real-time PCR-ga ESBL<sub>A</sub> geenid (*bla*<sub>SHV</sub>, CTX-M).

Tulemused:

(1) ESBL positiivsete *E. coli* tüvede feno- ja genotüübiline võrdlus

Fenotüübi alusel oli 5% *E. coli* tüvedest ESBL-positiivsed ning domineeris ESBL<sub>A</sub> grupp. ESBL<sub>A</sub> geenidest oli *bla*<sub>SHV</sub> geen 1/5 tüvedest ja CTX-M klasteri geenid 95%. CTX-M geeni klasteritest esinesid kõige sagedamini CTX-M-1 ja CTX-M-9 klasterite geenid, ainult üksikud tüved olid CTX-M-2 ja CTX-M-8/25 klasteri geenidega. Fenotüübilised ESBL<sub>A</sub> *E. coli* tüved kandsid enamasti CTX-M-1 ja vähem CTX-M-9 klasteri gene võrreldes ESBL<sub>M</sub> fenotüübiga.

(2) ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogruppide ja ST131 klooni seos ESBL<sub>A</sub> geenidega

*E. coli* A ja B1 fülogrupid olid seotud CTX-M-1 ning B2 ja D fülogrupid olid seotud nii CTX-M-1 kui CTX-M-9 klasteritega. B2 fülogrupi tüvedest moodustasid 83% *E. coli* ST131 klooni. ESBL<sub>A</sub> geenid olid sarnaselt jaotunud *E. coli* ST131 kloonsete ja mittekloonsete tüvede vahel.

(3) *E. coli* ESBL<sub>A</sub> geenide epidemioloogia ja ST131 klooni levik Balt mere piirkonnas

Geen *bla*<sub>SHV</sub> esinemissagedus oli kõikide riikide tüvede seas madal. CTX-M-1 klasteri geenide esinemissagedus oli kõrgem Lätis ja Venemaal võrreldes Eesti ja Leeduga. CTX-M-9 klasteri geeniga tüvesid oli rohkem Leedu ja Eesti tüvede seas. *E. coli* ST131 klooni esinemissagedus oli kõrgem Balti maades ning madalam Venemaal.

# The phenotypic and genotypic characterization of clinical strains producing extended-spectrum beta-lactamase in the Baltic Sea region

Kristiine Pai

## Summary

*Escherichia coli* is a rod-shaped Gram-negative bacterium that is a frequent cause of extraintestinal diseases, such as urinary tract infections, bacteremia and meningitis. Among gram-negative bacteria beta-lactamases continue to be the leading cause of resistance to beta-lactam antibiotics. In recent years there has been an increased occurrence and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), enzymes that hydrolyze and cause resistance to oxyimino-cephalosporins and aztreonam. ESBLs are classified according to the scheme of Giske *et al.* (2009) into three classes: ESBL<sub>A</sub> (CTX-M, SHV, TEM), ESBL<sub>M</sub> (AmpC, OXA-ESBLs), ESBL<sub>CARBA</sub> (NDM, KPC). Molecular epidemiology suggests that the ESBLs genes have been disseminated either by epidemic strains or by transferring plasmids carrying the resistance traits.

The aim of this study was: (1) To assign the ESBL<sub>A</sub> and ESBL<sub>M</sub> phenotype to clinical ESBL-positive *E. coli* strains, evaluate the prevalence of ESBL<sub>A</sub> (CTX-M, *bla*<sub>SHV</sub>) genes; (2) Designate the phylogenetic groups of *E. coli*, detect the clone ST131 and describe the prevalence of ESBL<sub>A</sub> genes; (3) Describe the molecular epidemiology of ESBLs and ST131 in Baltic countries and in Russia (St. Petersburg).

The results of this study were following:

(1) According to the phenotypic ESBL screening test, 5% of all strains were ESBL-positive. The ESBL<sub>A</sub> phenotype dominated. Molecular detection of *bla*<sub>SHV</sub> showed that all *E. coli* strains from different Baltic countries and St. Petersburg were similar, carrying *bla*<sub>SHV</sub> almost at the same rate (1/5). CTX-M gene was detected among 95% of the strains. The majority of CTX-M positive strains carried subgroup CTX-M-1, CTX-M-9 and only few strains had genes from subgroups CTX-M-2 and CTX-M-8/25.

(2) *E. coli* phylogenetic groups A and B1 were associated with CTX-M-1 and group D was associated with CTX-M-1 and also CTX-M-9. Among B2, phylogenetic group ST131 represented 83% of the isolates. ESBL<sub>A</sub> genes were distributed similarly in ST131 and non-ST131.

(3) The prevalence of *bla*<sub>SHV</sub> was low in all strains from different Baltic countries and Russia. The prevalence of CTX-M-1 was higher in Latvia and Russia compared to Estonia and Lithuania. Strains with CTX-M-9 were more present among strains from Lithuania and Estonia. The prevalence of ST131 was higher among strains from Baltic countries than Russia.

## **Kasutatud kirjandus:**

- Abraham, E.P., Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*; 146:837
- Alsultan, A.A., Aboulmagd, E., Amin, T.T. (2013). ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Al-Ahsa, Saudi Arabia: antibiotic susceptibility and prevalence of blaSHV and blaTEM. *J Infect Dev Ctries*; 7(12):1016-9
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J*; 276:269
- Balode, A., Punda-Polić, V., Dowzicky, M.J. (2013). Antimicrobial susceptibility of gram-negative and gram-positive bacteria collected from countries in Eastern Europe: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2004-2010. *Int J Antimicrob Agents*; 41(6):527-35
- Baudry, P.J, Nichol, K., DeCorby, M., Lagacé-Wiens, P., Olivier, E., Boyd, D., Mulvey, M.R, Hoban, D.J, Zhanel, G.G. (2009). Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 63(3):319-26
- Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*; 18, 294-298
- Bauernfeind, A.I., Stemplinger, R., Jungwirth, S., Casellas, J. M. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch*; 40:509-513
- Beld van de, M.J., Reubsæet, F.A. (2012). Differentiation between Shigella, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31(6):899-904
- Bergthorsson, U., Ochman, H. (1998). Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*;15: 6-16
- Bielaszewsk, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Köck, R. et al. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis*; 56(10):1373-81
- Birkett, C.I., Ludlam, H.A., Woodford, N., Brown, D.F., Brown N.M., Roberts, M.T., Milne, N., Curran, M.D. (2007). Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol*; 56(Pt 1):52-5
- Boll, E.J., McCormick, B.A. (2012). A new understanding of enteroaggregative *Escherichia coli* as an inflammatory pathogen. *Cell Adh Migr*; 6(5):413-8
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobe Agents Ch*; 48, no.1. pp.1-14

- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J. (2000). A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Agents Chemother*; 44(7):1936-42
- Boyd, D.A., Tyler, S., Christianson, A., McGeer, M.P., Muller, B.M., Willey, E., Bryce, M., Gardam, P., Mulvey, M. R. (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Ch*; 48:3758-3764
- Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 14(4):933-51
- Branger, C.O., Zamfir, S., Geoffroy, G., Laurans, G., Arlet, H.V., Thien, S., Gouriou, B., Denamur, P.E. (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis*; 11(1): 54-61
- Brisse, S., Diancourt, L., Laouénan, C., Vigan, M., Caro, V., Arlet, G., Drieux, L., Leflon-Guibout, V., Mentré, F., Jarlier, V., Nicolas-Chanoine, M.H. (2012). Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol*; 50(9):2974-81
- Brolund, A., Edquist, P.J., Mäkitalo, B., Olsson-Liljequist, B., Söderblom, T., Wisell, K.T., Giske, C.G. (2013). Epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011; *Clin Microbiol Infect*.10.1111/1469-0691.12413
- Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(34):12879-84
- Brunton, J., Clare, D., Meier, M.A. (1986). Molecular epidemiology of antibiotic resistance plasmids of *Haemophilus* species and *Neisseria gonorrhoeae*. *Rev Infect Dis*; 8(5):713-24
- Bukh, A.S., Schönheyder, H.C., Emmersen, J.M., Sogaard, M., Bastholm, S., Roslev, P. (2009). *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Ch*; 64(1):163-8
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medieros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; 39(6):1211-33
- Bush, K., Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *J Antimicrob Agents Ch*; 54(3):969-76
- Card, D.J., Gorska, R., Cutler, J., Harrington, D.J. (2013). Vitamin K metabolism: Current knowledge and future research. *Mol Nutr Food Res*; 0, 1-11



- Cicke, C.A., Saral, A., Ozad, D.A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem, B. *et al.* (2013). Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *J Antibiot (Tokyo)*; 66(11):647-50
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Nordmann, P., Ruppe, E., Sarthou, J.L., Frank T., Vimont, S., Arlet, G., Branger, C., Woodford, N., Denamu, E. (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemoth*; 64, 274-277
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*; 66(10):4555-8
- Cooke, N.M., Smith, S.G., Kelleher, M., Rogers, T.R. (2010). Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol*; 48(4):1099-104
- Coque<sup>A</sup>, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*; 14(2):195-200
- Coque<sup>B</sup>, T.M., Baquero, F., Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*; 20:13(47)
- Datta, N., Richmond, M. H. (1966). The purification and properties of a penicillinase whose synthesis is mediated by an R-factor in *Escherichia coli*. *Biochem J*; 98(1):204-9
- De Moura, C., Fregolente, M.C., Martini, I.J., Domingos, D.F., Da Silva, E.J., Ferraz, M.M., Gatti, M.S., da Silva Leite, D. (2012). Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. *J Infect Dev Ctries*; 6(2):176-80
- Decousser, J. W., Poirel, L., Nordmann, P. (2001). Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyveromyces fragilis*. *Antimicrob Agents Ch*; 45(12):3595-8
- Dobrindt, U., Chowdary, M.G., Krumbholz, G., Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*; 199(3):145-54
- Dolejska, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S., Literak, I. (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemoth*; 66(12):2784-90
- Drawz, S.M., Papp-Wallace, K.M., Bonomo, R.A. (2014). New  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. *Antimicrob Agents Ch*; 58(4):1835-46
- Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff ja V. Jarlier. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect 14 Suppl*; 1: 90-103

- Dumpis, U., Iversen, A., Balode, A., Saule, M., Miklasevics, E., Giske, C.G. (2010). Outbreak of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 199 in a Latvian teaching hospital. *APMIS*; 118(9):713-6
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B., Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*; 147(Pt 6):1671-6
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Ch*; 47(12):3724-32
- Eftekhari, F., Rastegar, M., Golalipoor, M., Mansoursamaei, N. (2012). Detection of Extended Spectrum B-Lactamases in Urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to Bla<sub>TEM</sub>, Bla<sub>SHV</sub> and Bla<sub>CTX-M</sub> Gene Carriage. *Iran J Public Health*; 41(3):127-32
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*; 21: 1085-1094
- Ford, B.A., Burnham, C.A. (2013). Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laserdesorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J Clin Microbiol*; 51(5):1412-20
- Gaschignard, J., Levy, C., Romain, O., Cohen, R., Bingen, E., Aujard, Y., Boileau, P. (2013). Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J*; 30(3):212-7
- Gibold, L., Robin, F., Tan, R.N., Delmas, J., Bonnet, R. (2014). Four-year epidemiological study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French teaching hospital. *Clin Microbiol Infect*; 20(1):O20-6
- Giske, S.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Canton, R., Walsh, T.R. (2009). Redefining extended-spectrum b-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemoth*; 63, 1–4
- Gordon, D.M. (2004). The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F., et al. (eds). American Society for Microbiology; [Online]<http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>
- Gordon, D.M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multilocus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*; 10(10):2484-96
- Grude, N., Potaturkina-Nesterova, N.I., Jenkins, A., Strand, L., Nowrouzian, F.L., Kristiansen, B. E. (2007). A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect*; 13(2): 208-211.

- Hall, B.G., Barlow, M. (2004). Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*; 7(2):111-23
- Helldal, L., Karami, N., Florén, K., Welinder-Olsson, C., Moore, E.R., Åhrén, C. (2013). Shift of CTX-M genotypes has determined the increased prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in south-western Sweden. *Clin Microbiol Infec*; 19(2):E87-90
- Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Yagi, M., Nishio, T., Kanda, T., Kawamori, F., Sugiyama, K., Masuda, T., Hara-Kudo, Y., Ohashi, N. (2012). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci*; 74(2):189-95
- Huemer, H. P., Eigentler, A., Aschbacher, R., Larcher, C. (2011). Dominance of CTX-M group 1 beta-lactamase enzymes in ESBL producing *E. coli* from outpatient urines in neighboring regions of Austria and Italy. *Wien. Klin. Wochenschr*; 123, 41-44
- Hussain, A., Ewers, C., Nandanwar, N., Guenther, S., Jadhav, S., Wieler, L.H., Ahmed, N. (2012). Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Ch*; 56(12):6358-65
- Jacoby, G.A., Medieros, A.A. (1991). More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob Agents Ch*; 35:1697-1704
- Johnson, J.R., Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*; 181(1):261-72
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M-3 like) from India and association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett*; 201:237-41
- Kluytmans, J.A., Overvest, I.T., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M.F., van der Zwaluw, K. (2013). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis*; 56(4):478-87
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsushashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*; 11, 315-317
- Knudsen, J.D., Andersen, S.E., Bispebjerg Intervention Group. (2014). A Multidisciplinary Intervention to Reduce Infections of ESBL- and AmpC Producing, Gram-Negative Bacteria at a University Hospital. *PLoS One*; 9(1):e86457
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*; 130(5):797-810

- Kola, A., Kohler, C., Pfeifer, Y., Schwab, F., Kuhn, K. (2012). High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Ch*; 67: 2631-2634
- Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S.H., Khan, M.S., Sheerin, N.S. (2005). Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J*; 81(952):83-6
- Köhler, C.D., Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *Int J Med Microbiol*; 301(8):642-7
- Le Gall, T.O., Clermont, S., Gouriou, B., Picard, X., Nassif, E., Tenailon, D.O. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol*; 24(11): 2373-2384
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., Denamur, E. (1998). *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol*; 15:1685-1695
- Lee, S., Yu, J.K., Park, K., Oh, E.J., Kim, S.Y., Park, Y.J. (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Ann Clin Lab Sci*; 40(4): 361-367.
- Livermore D.M. (2008). Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol Infect*; 14 (Suppl1):3-10
- Lupo, A., Papp-Wallace, K.M., Sendi, P., Bonomo, R.A., Endimiani, A. (2013). Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 77(3):179-94
- Lõivukene, K., Kermes, K., Sepp, E., Adamson, V., Mitt, P., Jürna, M., Mägi, H., Kallandi, Ü., Otter, K., Naaber, P. (2006). The comparison of susceptibility patterns of Gram-negative invasive and non-invasive pathogens in Estonian hospitals. *Antonie van Leeuwenhoek*; 89(3-4), 367-371
- Lytsy, B., Sandegren, L., Tano, E., Torell, E., Andersson, D.I., Melhus, A. (2008). The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of amultiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS*; 116(4):302-8
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., Peixe, L. (2013). Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal; 4:80
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M. P., Gibson, T., Cohen, P. S., Conway, T. (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One*; 8(1):e53957
- Markovska, R., Schneider, I., Ivanova, D., Mitov, I., Bauernfeind, A. (2013). Predominance of IncL/M and IncF plasmid types among CTX-M-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgarian hospitals. *APMIS*. Dec 5. doi: 10.1111/apm.12204
- Matsumoto, Y.F., Ikeda, T., Kamimura, Y., Mine, Y.Y., (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Ch*; 32(8):1243-6

- Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis*; pp. S19-S45
- Mokracka, J., Oszyńska, A., Kaznowski, A. (2013). Increased frequency of integrons and  $\beta$ -lactamase-coding genes among extraintestinal *Escherichia coli* isolated with a 7-year interval. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 103(1):163-74
- Monk, J.M., Charusanti, P., Aziz, R.K., Lerman, J.A., Premyodhin, N., Orth, J.D., Feist, A.M., Palsson, B.Ø. (2013). Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Escherichia coli* strains highlight strain-specific adaptations to nutritional environments. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 110(50):20338-43
- Naaber, P., Koljalg, S., Maimets, M. (2000). Antibiotic usage and resistance – trends in Estonian University Hospitals. *Int J Antimicrob*; 16(3):309-15
- Naseer, U., Haldorsen B., Tofteland, S., Hegstadm, K., Scheutz, F., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A; Norwegian ESBL Study Group. (2009). Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS*; 117(7):526-36
- Nicolas-Chanoine, M.H, Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Caniça, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J., Johnson, J.R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Ch*; 61(2):273-81
- Nicolas-Chanoine, M.H, Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., Moyat, M., Meiller, E., Marcon, E., Danchin, N., Noussair, L., Moreau, R., Leflon-Guibout V. (2013). 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Ch*; 68(3):562-8
- Nielsen, K.L., Dynesen, P., Larsen, P., Frimodt-Møller, N. (2014). Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy controls who have never had a urinary tract infection. *J Med Microbiol*; 63(Pt 4):582-9
- Novais, A., Cantón, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M. (2007). Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1 like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Ch*; 51(2):796-9
- Numanovic, F., Hukic, M., Delibegovic, Z., Tihic, N., Pasic, S., Gegic, M. (2013). Comparison of double disk synergy test, VITEK 2 and Check-MDR CT102 for detection of ESBL producing isolates. *Acta Med Acad*; 42(1):15-24
- Olesen, B., Hansen, D.S., Nilsson, F., Frimodt-Møller, J., Leihof, R.F., Struve, C., Scheutz, F., Johnston, B., Krogfelt, K.A., Johnson, J.R. (2013). Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *J Clin Microbiol*; 51(6):1779-85

- Onnberg, A., Mölling, P., Zimmermann, J., Söderquist, B. (2011). Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS*;119(4-5):287-95
- Ostblom, A., Adlerberth, I., Wold, A.E., Nowrouzian, F.L. (2011). Pathogenicity island markers, virulence determinants malX and usp, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Appl Environ Microbiol*; 77(7):2303-8
- Philippon, A., Labia, R., Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch*; 33(8):1131-6
- Pitout, J.D, Campbell, L., Church, D.L. (2009). Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-b-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. *Antimicrob Agents Ch*; 53: 2539-43
- Pitout, J.D., Laupland, K.B., Church, D.L., Menard, M.L., Johnson, J.R. (2005). Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Ch*; 49(11):4667-70
- Platteel, T.N., Cohen, S.J., Voets, G. *et al.* (2011). Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates from the routine clinical setting. *Clin Microbiol Infect*; 17: 1435-1438
- Ramazanzadeh, R. (2010). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of *Klebsiella* spp. *African Journal of Microbiology Research*; 4 (13), pp. 1359-1362
- Rettedal, S., Löhr, I.H., Natås, O., Giske, C.G., Sundsfjord, A., Øymar, K. (2012). First outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *APMIS*; 120(8):612-21
- Reuland, E.A., Hays, J.P., de Jongh, D.M., Abdelrehim, E., Willemsen, I., Kluytmans, J.A., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Al Naiemi, N. (2014). Detection and Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC in Highly Resistant Gram-Negative Rods. *PLoS One*; 9(3):e91396
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Ch*; 66:1-14
- Rojas, L., Muñoz, P., Kestler, M., Arroyo, D., Guembe, M., Rodríguez-Créixems, M., Verde, E., Bouza, E. (2013). Bloodstream infections in patients with kidney disease: risk factors for poor outcome and mortality. *J Hosp Infect*; 85(3):196-205
- Santona, S., Diaz, N., Fiori, P.L., Francisco, M., Sidat, M., Cappuccinelli, P., Rappelli, P. (2013). Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. *J Infect Dev Ctries*; 7(3):214-9
- Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P., Mikelsaar, M. (2009). The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli*

isolates from infants and elderly persons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*; 8(34), 1-6

Seputiene, V., Linkevicius, M., Bogdaite, A., Povilonis, J., Planciūniene, R., Giedraitiene A. (2010). Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Lithuania. *J Med Microbiol*; 59. pp. 1263-1265

Starlander, G., Yin, H., Edquist, P., Melhus, A. (2014). Survival in the environment is a possible key factor for the expansion of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *APMIS*; 122(1):59-67

Štšepetova, J., Sepp, E., Trusalu, K., Lõivukene, K., Hütt, P., Songisepp, E., Mikelsaar, M. (2006). The prevalence of mobile gene cassettes in indigenous gut microbiota and dairy starter bacteria. *Reprod Nutr Dev*; 21-23

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol*; 33(9):2233

Tham, J., Odenholt, I., Walder, M., Brolund, A., Ahl, J., Melander, E. (2010). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis*; 42(4):275-80

Tofteland, S., Haldorsen, B., Dahl, K.H., Simonsen, G.S., Steinbakk, M., Walsh, T.R., Sundsfjord, A. (2007). Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol*; 45(1):199-205

Trang, N.H., Nga, T.V., Campbell, J.I., Hiep, N.T., Farrar, J., Baker, S., Duy, P.T. (2013). The characterization of ESBL genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infections in Vietnam. *J Infect Dev Ctries*; 7(12):922-8

Valverde, A., Coque, T.M., Sánchez-Moreno, M.P., Rollán, A., Baquero, F., Cantón. R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol*; 42(10):4769-75

Vilchez, S., Becker-Dreps, S., Amaya, E., Perez, C., Paniagua, M., Reyes, D., Espinoza, F., Weintraub, A. (2014). Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Nicaraguan children in the hospital, primary care, and community settings. *J Med Microbiol*; 63(Pt 5):729-34

Vollmerhausen, T.L., Katouli, M. (2014). Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 33(6):975-82

Younes, A., Hamouda, A., Dave, J., Amyes, S.G. (2010). Prevalence of transferable blaCTX-M-15 from hospital- and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* isolates in Scotland. *J Antimicrob Ch*; 66(2):313-8

**Muud allikad:**

Lutsar, I., Mikelsaar, M., Karki, T. (2007). Meditsiiniline mikrobioloogia: bakterioloogia ja mükoloogia" II osa, Tartu.

Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark. (2011). Enteric Bacteria, p 522-524. In M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, Biology of Microorganisms, 13th ed., Pearson.

Schaechter, M. (2009). *Escherichia coli*, p 125-132. In M. Schaechter, Encyclopedia of Microbiology, 3rd ed., vol. 2. Elsevier Academic Press.

*Clinical and Laboratory Standards Institute*. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M 100-S21. Wayne, PA, USA; (CLSI; 2011)

*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0 [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints); (EUCAST; 2013)

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Stockholm: (ECDC, 2013)

<http://www.lahey.org/studies/>



## **Tänuavaldused**

Sooviksin tänada oma juhendajaid Epp Seppa, Siiri Kõljalga ja TÜMRI poolset kaasjuhendajat Andres Mäe`d, kes juhendasid mind magistritöö ajal ning olid alati abiks.

Samuti tahaksin tänada oma töökollektiivi TÜ Mikrobioloogia Instituudist, eriti Kristi Huiki ja Jelena Štšepetova hea nõu ja abi eest.

## **Lihtlitsents**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristiine Pai

(sünnikuupäev: 14.09.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Balti regioonis kliinilistest materjalidest isoleeritud *Escherichia coli* tüvede laiendatud toimega beeta-laktamaaside produktsiooni fenotüübiline ja genotüübiline iseloomustus”, mille juhendajad on Epp Sepp ja Siiri Kõljalg.

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.01.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014