

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

Katri Pärna

**Integronid Läänemere riikide
inimestelt isoleeritud enterobakterites**

Magistritöö

Juhendajad: vanemteadur Epp Sepp, MD, PhD
Tartu Ülikool, mikrobioloogia instituut

teadur Siiri Kõljalg, MD, PhD
Tartu Ülikool, mikrobioloogia instituut

Kaasjuhendaja: vanemteadur Eve Vedler, PhD
Tartu Ülikool, molekulaar- ja rakubioloogia instituut

Tartu 2015

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
1. SISSEJUHATUS	6
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
2.1. Mõisted	7
2.2. Integronid.....	7
2.2.1. Integronide struktuur	8
2.2.2. Integronide klassifikatsioon.....	10
2.2.3. Integronide esinemissagedus bioloogilistes materjalides	11
2.3. Enterobakterid.....	12
2.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	13
2.4. Antibiootikumresistentsus	13
2.4.1. Resistentsuse leviku mehhanismid	14
2.4.2. Integronid ja antibiootikumresistentsus.....	14
2.4.3. Enterobakterid ja antibiootikumresistentsus.....	15
2.5. Beeta-laktaamantibiootikumid.....	15
2.5.1. Beeta-laktaamantibiootikumide iseloomustus.....	15
2.5.2. Beeta-laktaamantibiootikumide klassifikatsioon.....	16
2.6. Laiendatud spektriga β -laktamaas	17
2.6.1. Laiendatud spektriga β -laktamaaside klassifikatsioon	17
2.6.2. Laiendatud spektriga β -laktamaas ja integronid.....	19
3. TÖÖ EESMÄRGID.....	21
4. MATERJAL JA METOODIKA.....	22
4.1. Uuringumaterjal	22
4.2. Uuringumetoodika	23
4.3. Töös kasutatud tunnused.....	25
4.4. Andmeanalüüs	25
5. TULEMUSED	27
5.1. Integronide esinemine ESBL positiivsetes <i>K. pneumoniae</i> ja <i>E. coli</i> bakteri- tüvedes Läänemere riikides	27
5.1.1. Integronide esinemine riigiti ja vastavalt kliinilisele materjalile.....	27
5.1.2. Integronide klasside esinemine riigiti ja vastavalt kliinilisele materjalile.....	31

5.2. Integronide esinemise seosed ESBL positiivsetes bakteritüvedes bakteriliigi, inimese vanuse, riigi ja kliiniliste materjalidega.....	33
5.3. Integronide esinemine Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes <i>E.coli</i> tüvedes	34
5.4. Integronide esinemine Eesti tervete inimeste soole mikrobiotast ja kliinilistest materjalidest isoleeritud <i>E. coli</i> tüvedes	36
6. ARUTELU	37
7. KOKKUVÕTE.....	42
8. SUMMARY	44
9. KASUTATUD KIRJANDUS	46
TÄNUAVALDUSED	46

KASUTATUD LÜHENDID

ARMMD projekt	„Antibiootikumresistentsuse molekulaarne multipleks diagnostika“ projekt
ARBRESIST projekt	projekt “Antibiootikumiresistentsuse levikuteed”
<i>Bla</i> -geenid	geenid, millelt kodeeritakse β -laktamaase
CI	Usaldusvahemik (ingl <i>confidence interval</i>)
CLSI	Kliiniliste ja Laboratoorsete Standardite Instituut (ingl <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
EARS-Net	antimikroobse resistentsuse seire üle-euroopaline võrgustik (ingl <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>)
EDTA	raskmetalli kelaator (ingl <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESBL	laiendatud toimespektriga β -laktamaas (ingl <i>extended-spectrum β-lactamase</i>)
EUCAST	antimikroobse tundlikkuse testimise Euroopa komitee (ingl <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
HGT	horisontaalne geeniülekanne (ingl <i>horizontal gene transfer</i>)
HUMB	Inimese Mikrobioota Biopank (ingl <i>Human Microbiology Biobank</i>)
Int1	klass 1 integron
Int2	klass 2 integron
Int3	klass 3 integron
<i>intI1</i>	klass 1 integroni integraasi geen
<i>intI2</i>	klass 2 integroni integraasi geen
<i>intI3</i>	klass 3 integroni integraasi geen
OR	šansisuhe (ingl <i>odds ratio</i>)
pCMB	p-kloro-elavhõbe-bensoaat (ingl <i>p-chloromercuribenzoate</i>)
RT PCR	reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (ingl <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
SD	standardhälve (ingl <i>standard deviation</i>)
UPEC	uropatogeenne <i>E. coli</i> (ingl <i>uropathogenic E. coli</i>)

1. SISSEJUHATUS

Enterobakterid on Gram-negatiivsed pulgakujulised bakterid, mis kuuluvad *Enterobacteriaceae* sugukonda. *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli* on ühed selle sugukonna tuntumad esindajad (Tenailon *et al.*, 2010). Nad kuuluvad inimese soolestiku normaalsesse mikrobiotasse, kuid võivad põhjustada ka infektsioone (Tenailon *et al.*, 2010; Yatsunenکو *et al.*, 2012; Ravi *et al.*, 2014;). Antibiootikumresistentsete *K. pneumoniae* ja *E. coli* põhjustatud infektsioonid haiglates on laialt levinud probleemiks kogu maailmas (Schofield, 2011; Pavelkovich *et al.*, 2014).

Arvatakse, et antibiootikumresistentsuse väljakujunemisel on oluline osa integronidel (Memariani *et al.*, 2014). Integronid kui geneetilised elemendid põhjustavad horisontaalse geeniülekanne, täpsemalt järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni teel antibiootikumresistentsete geenide levikut erinevate bakterite vahel. Viimase aastakümne jooksul on integrone sisaldavate enterobakterite arv suurenenud (Cambray *et al.*, 2010; Ravi *et al.*, 2014).

Bakterite kõige enam levinud resistentsusmehhanism on β -laktaamantibiootikumide vastu. Bakteri resistentsust põhjustab β -laktaamantibiootikumide struktuuri lagundavate ensüümide produktsioon (Türk, 2015). Resistentsuse leviku põhjuseks on see, et β -laktaamantibiootikumid on enimkasutatud ja sageli põhjendamatult raviks määratud antibiootikumide rühm meditsiinis (Davies & Davies, 2010; Bush, 2012; Sedláková *et al.*, 2014). Enterobakteritel on tuvastatud laiendatud spektriga β -laktamaase tootvate geenide esinemissageduse kasvu (Schofield, 2011). Kui enterobakterites on leitud kõrge integronide esinemissagedus ja need bakterid omavad sageli laiendatud spektriga β -laktamaase, siis seostatakse integrone β -laktaamresistentsust põhjustavate geenide levikuga (Cambray *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2012; Karimi *et al.*, 2012; Rizi *et al.*, 2015).

Antibiootikumresistentsuse kasv viimasel kümnendil meditsiinis ja kõigi bakterite resistentsust põhjustavate mehhanismide vähene teadmine viitab vajadusele seda valdkonda põhjalikumalt uurida, et otsida seletusi ning lahendusi resistentsuse kiirele kasvule (Karimi *et al.*, 2012; Kargar *et al.*, 2014; Ravi *et al.*, 2014).

Käesolevas magistritöös uuritakse integronide esinemist inimeste bioloogilistest materjalidest isoleeritud enterobakterites Läänemere riikides.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Mõisted

Antibiootikumresistentsus	Bakteri võime mitte alluda antibiootikumide toimele.
β -laktaamantibiootikumid	Bakteritsiidse toimega antibiootikumide rühm, mille ühiseks struktuurseks tunnuseks on β -laktaamrõnga esinemine (Bush, 2012).
β -laktamaasid	Ensüümid, mida produtseerivad bakterid, mis on resistentsed β -laktaamantibiootikumidele, lõhkudes nende antibiootikumide β -laktaamrõnga (Bush, 2012).
Integronid	Bakteriaalset päritolu geneetilised elemendid, mis püüavad järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni teel geenikassette ja ekspresseerivad geenikassetis sisalduvaid antibiootikumi resistentsusgeene (Barraud et al., 2010; Cambray et al., 2010; Gillings, 2014).
Enterobakterid	Pulgakujulised Gram-negatiivsed fakultatiivsed anaeroobid, mis kuuluvad bakterisugukonda enterobakterid (<i>Enterobacteriaceae</i>) (Tenaillon et al., 2010).
Geenikassett	Geneetilist päritolu elemendid, mis sisaldavad üht lugemisraami ja spetsiifilist rekombinatsioonisaiti <i>attC</i> , tavaliselt promootor puudub (Domingues et al., 2012).

2.2. Integronid

Integronid kui bakteriaalset päritolu geneetilised elemendid püüavad järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni teel geenikasette, mis sisaldavad ilma promootorita antibiootikumi resistentsusgeene (Cambray et al., 2010; Gillings, 2014; Barraud & Ploy., 2015). Sattudes järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni teel integriini koosseisu, ekspresseerib geene integriini promootor *Pant* (Ravi et al., 2014).

Integrone on leitud erinevate bakterite transposoonide, plasmiidide, bakteriofaagide ja kromosoomide koosseisust (Fluit & Schmitz, 2004; Rao et al., 2006; Ravi et al., 2014).

Eriti palju on neid leitud Gram-negatiivsetest bakteritest (sh enterobakteritest) ja need on tuntud kui antibiootikumi resistentsusgeenide markerid (Barraud et al., 2010; Gillings, 2014; Kargar et al., 2014; Ravi et al., 2014). Resistentsust põhjustavad integronid võivad üle kanduda nii sama liigi kui erinevast liigist bakterite kromosoomide ja plasmiidide vahel (Sompolinsky et al., 2005).

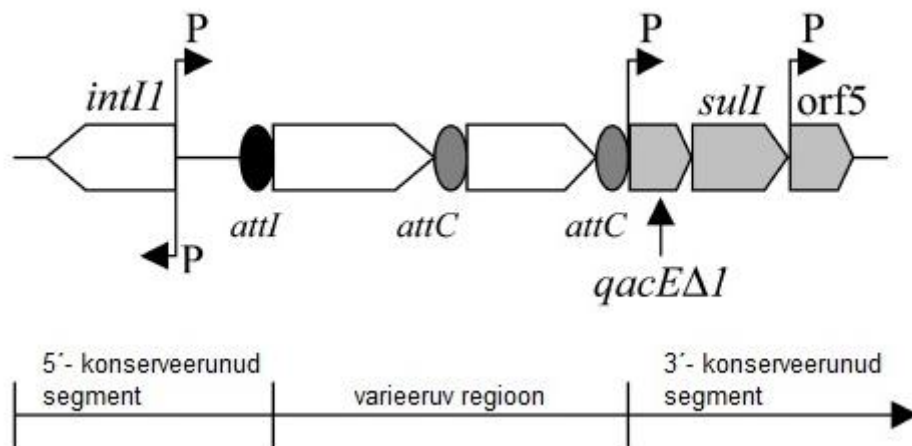
2.2.1. Integronide struktuur

Integroni järjestuse pikkus varieerub, kuna võib sisaldada ühte kuni kaheksat geenikasseti (superintegronide korral veel rohkem), kuid on alati piiritletud otsmiste 5' ja 3' konserveerunud järjestustega (Mazel, 2006; Gillings, 2014). Integroni järjestuse 5' konserveerunud segment sisaldab alati kolme komponenti:

- integraasi sünteesi määrav geen *intI*;
- järjestus-spetsiifiline rekombinatsioonisaat *attI*, mis võimaldab püüda geenikassette;
- promootor *pANT*, mis vastutab geenikassetis oleva ravimresistentsus-geeni ekspressiooni eest, kuna see ei oma promootorit (Gombac et al., 2002) (Joonis 1).

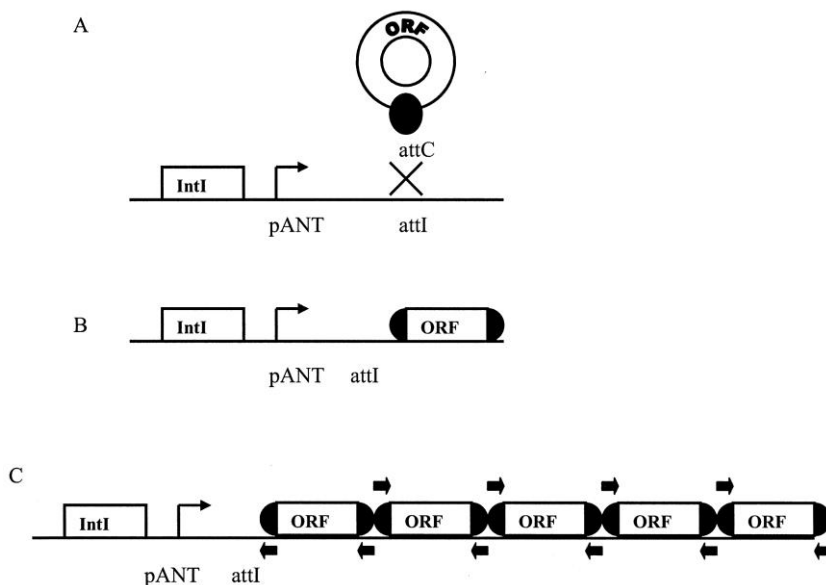
Selles piirkonnas paiknevad veel 3 erinevat lugemisraami ORF1, ORF2 ja ORF3, millest viimane vastutab integraasi sünteesi eest. 3' konserveerunud segment varieerub pikkuselt ja pole täpselt defineeritud. Paljudel integronidel sisaldab antud piirkond sulfoonamiid-resistentsusgeeni *sulI* (Cambray et al., 2010) (Joonis 1).

Geenikassetil sisalduvad geenid seonduvad integroni järjestusse järjestus-spetsiifilise rekombinatsiooni teel integroni rekombinatsioonisaidi *attI* ja geenikasseti rekombinatsioonisaidi *attC* vahele (Joonis 2). Järjestus-spetsiifiline rekombinatsioon vajab vastava järjestuse esinemist mõlemas rekombineeravas DNA molekulis. Nii integronis kui ka geenikassetis on selleks ühiseks järjestuseks triplett GTT. Üks asub rekombinatsioonisaidi 5'otsas ja teine 3'otsas (Waites, 2000).



Joonis 1. Integroni struktuur klass 1 integroni näitel (Drouin et al., 2002).

P – promootor *pANT*; *intI1* – integraasi geen; *attI* ja *attC* – vastavalt integroni ja geenikasseti rekombinatsioonisaad; *qacEΔ1* – ammooniumühendi resistentsusgeen; *sulI* – sulfoonamiid resistentsusgeen; *orf5* – avatud lugemisraam;



Joonis 2. Geenikasseti sisenemine integroni järjestusse (Nemergut et al., 2004).

IntI – integraasi geen; *pANT* – promootor; *attI* ja *attC* – rekombinatsioonisaadid; ORF – avatud lugemisraam;

2.2.2. Integronide klassifikatsioon

Integronid on klassidesse jaotatud *intI* geenide alusel (Seward, 1999; Cambray et al., 2010; Ravi et al., 2014). Integronide klassid on omakorda jaotatud kahte suuremasse rühma (Fluit & Schmitz, 2004):

- resistentsed integronid (RI), kuhu kuuluvad klass 1 (Int1), klass 2 (Int2) ja klass 3 (Int3) integronid.
- superintegronid, kuhu kuuluvad kõik integronid, mis sisaldavad vähemalt 100 geenikassetti oma järjestuses ja asuvad alati bakteri kromosoomi koosseisus (Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Gillings, 2014).

Resistentsed integronid

Klass 1 integronid on kõige laiemal levikuga integronide klass. Seda on leitud inimese konnaalsetest ja patogeensetest bakteritüvedest ning loomadelt ja keskkonnast (muld ja vesi) isoleeritud bakteritest (Domingues et al., 2012). Kirjanduse andmetel on klass 1 integrone leitud 22–76% Gram-negatiivsetest ja harvem ka Gram-positiivsetest kliinilistest isolaatidest (Seward, 1999; Shi et al., 2006; Solberg et al., 2006; Van Essen-Zandbergen et al., 2007; Cambray et al., 2010). Kui 5' järjestus on sama kõigis klass 1 integronides, siis 3' järjestuse pikkus varieerub ulatudes üle *sulI* geeni (Seward, 1999; Cambray, 2010; Domingues et al., 2012). Kõige sagedamini sisaldab klass 1 integroni 3' konserveerunud järjestus sulfoonamiid-resistentsusgeeni *sulI* ja ammoniumühendi resistentsusgeeni *qacEΔI* ning kahte avatud lugemisraami (ORF5 ja ORF4).

Klass 2 integronid. Neid on leitud transposoon *Tn7* koosseisust ja selle derivaatidest (Fluit & Schmitz, 2004; Cambray et al., 2010; Ramírez et al., 2010). Seda klassi ei ole täielikult kirjeldatud, kuid on leitud, et klass 2 integroni 5' konserveerunud järjestuses on integraasi geen *intI2*, mis on 40% ulatuses sarnane *intI1* geeniga (Seward, 1999). Integraasi geen *intI2* on aga sel integronide klassil inaktiivne, seetõttu on integronis sisalduv geenikassettide piirkond kõrgelt konserveerunud (Gillings, 2014). 3' konserveerunud järjestuse pikkus varieerub samuti nagu klass 1 integronidel.

Klass 3 integronid. Kirjeldatud on vaid üht tüüpi klass 3 integroni. See sisaldab metallo-β-laktamaasi geeni. *IntI3* geen, mis asub metallo-β-laktamaasi kasseti 5' otsas, on klass 1 integronide integraasi geeniga 61% ulatuses identne, mis võib olla tingitud nende ühisest evolutsioonilisest päritolust (Seward, 1999; Gillings, 2014). Klass 3 integron on leitud sarnaselt klass 2 integronile transposooni järjestusest. Klass 3 integronid on veel täielikult

kirjeldamata struktuuriga, kuid mitmetest klass 3 integronide järjestustest on leitud kolme tüüpi geenikassette. Integronide klass 3 esinemist seostatakse bakterite ESBL mehhanismi esinemisega (Rizi et al., 2015).

Superintegronid

Superintegronid erinevad teistest integronide klassidest selle poolest, et võivad sisaldada oma järjestuses rohkem kui 100 geenikasseti võrreldes teiste integronide klasside maksimaalselt kaheksa geenikassetiga (Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Ravi et al., 2014). Rohke arvu geenikassetide omamine tagab superintegronide multifunktsionaalsuse: nad omavad resistentsust nii antibiootikumidele kui ka desinfitseerimisvahenditele. Samas klass 1 kuni 3 integronid omavad vaid antibiootikumi resistentsusgene (Fluit & Schmitz, 2004; Sompolinsky et al., 2005). Superintegrone on leitud ainult bakterite kromosoomi koosseisust ja need on liigspetsiifilised (Fluit & Schmitz, 1999; Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Ravi et al., 2014). Superintegrone peetakse resistentsete integronide eellasteks ja mõne klassifikatsiooni kohaselt ei eksisteeri neid üldse, kuna nad on struktuurilt teiste klassidega sarnased ja neid on veel vähe uuritud (Ravi et al., 2014).

2.2.3. Integronide esinemissagedus bioloogilistes materjalides

Gram-negatiivsetes bakterites, mis on isoleeritud kliinilistest materjalidest, esineb klass 1 integrone kõige rohkem (Rao et al., 2006; Idrees et al., 2011; Domingues et al., 2012; Chen, 2013; Gillings, 2014; Memariani et al., 2014). Klass 1 integronide struktuuris esinevaid geenikassette on detekteeritud kokku 73-s riigis (Domingues, 2015).

Verest isoleeritud tüved. Prantsusmaal isoleeriti patsientide verest *E. coli* tüved, mis sisaldas integrone 98,8% juhtudest (Barraud et al., 2014). Sarnaselt leiti integronide kõrge esinemissagedus (77,6%) patsientide verest isoleeritud ESBL produtseerivates *E. coli* tüvedes Hiinas (Li et al., 2014). Hispaanias sisaldas 40% patsientide verest isoleeritud *E. coli* tüvedest klass 1 ja 2 integrone (Vinué et al., 2010). Veel on leitud, et 54,5% patsientide verest isoleeritud *E. coli* tüvedest sisaldas klass 1 integrone (Abdelhaleem et al., 2014).

Uriinist isoleeritud tüved. UPEC (uropathogenic *E. coli*) projekti andmetel on integronide esinemissagedus Euroopa ja Aasia uropatogeensetes *E. coli* tüvedes vahemikus 22–59% (Solberg et al., 2006). Kuid hilisemate andmete järgi on leitud ka veel kõrgemat integronide esinemissagedust. Näiteks Eesti uuringus leiti, et põelonefriiti haigestunud laste uriinist isoleeritud *E. coli* tüvedest 75% sisaldasid klass 1 integriini (Kõljalg et al., 2014). Hiinas esines klass 1 integrone uriinist isoleeritud *K. pneumoniae* 66,1% ja *E. coli* 63,7% tüvedes

(Grape et al., 2005; Sun et al., 2013). Harvem on detekteeritud klass 2 ja klass 3 integrone (Memariani et al., 2014). Pakistanis leiti 45,6% uropatogeensetes *E. coli* tüvedes klass 1 integrone ja 3% tüvedes klass 2 integrone ning ühtegi klass 3 integroni ei esinenud (Idrees et al., 2011). Nii näitavad mitmete uuringute tulemused, et just klass 1 integronide esinemissagedus on uriinist isoleeritud enterobakterites kõrge.

Hingamisteede ja haavaeritisest isoleeritud tüved. Uuringute põhjal on hingamisteede eritisest isoleeritud *E. coli* tüvedes leitud integrone 25,6% (Pereira & Cardoso, 2014) ja haava eritisest 44,4% juhtudest (Abdelhaleem et al., 2014).

Normaalsest mikrobiotast isoleeritud tüved. Integronide esinemist patogeensetes bakterites on palju uuritud, aga integronide esinemist inimese normaalses mikrobiotas mitte. Kuna bakterite arvukus roojas on väga kõrge, siis on see ideaalne koht kommensaalsete bakterite resistentsusmehhanismide edasikandumiseks (Ravi et al., 2014).

Näiteks sisaldas 31,5% inimese normaalsest mikrobiotast isoleeritud *E. coli* tüvedest integrone (Yang et al., 2009). Eesti uuringus leiti, et 49% kommensaalsetest *E. coli* tüvedest sisaldasid klass 1 integrone. Samas uuringus leiti, et imikute normaalsest mikrobiotast isoleeritud *E. coli* tüved sisaldasid rohkem integrone (53%) kui tervetel eakatel inimestel (17%) (Sepp et al., 2009).

2.3. Enterobakterid

Enterobakterid (*Enterobacteriaceae*) on üks enimuuritud Gram-negatiivsete pulgakujuliste bakterite sugukond, kuhu kuulub 53 perekonda. Tegu on fakultatiivsete anaeroobidega, mis elavad inimeste ja püsisoojaste loomade soolestikus, heitvetes, pinnases ja looduslikes veekogudes. Enterobakterite sugukonda kuuluvad tinglikult patogeensed/oportunistlikud liigid kui ka paljud tuntud patogeensed liigid, mis põhjustavad seedetrakti siseseid ja väliseid infektsioone (näiteks perekondadest *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Serratia*, *Citrobacter*) (Eskola et al., 2000; Tenaillon et al., 2010). Nii *K. pneumoniae* kui *E. coli* levivad kiiresti läbi kokkupuute patsientide ja meditsiinitöötajatega või meditsiinivahendite kaudu, tekitades infektsioonipuhanguid eelkõige haiglates (ECDC, 2014).

2.3.1. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae on sugukonda *Enterobacteriaceae* ja perekonda *Klebsiella* kuuluv pulgakujuline Gram-negatiivne bakter. *K. pneumoniae* on selle sugukonna üks tuntumaid

esindajaid. See bakter kuulub inimese soolestiku normaalsesse mikrobiootasse, kuid võib põhjustada sooleväliseid infektsioone. Patogeenne *K. pneumoniae* on globaalselt tuntud kui oluline haiglate ja kogukondade infektsioone põhjustav patogeen (Lopes et al., 2005; Minarini et al., 2007; Yu et al., 2007; Lopes et al., 2010). On leitud, et perekond *Klebsiella* esindajad põhjustavad umbes 10% hospitaalsetest kuseteedeinfektsioonidest (Eskola et al., 2000). *K. pneumoniae* tüvesid seostatakse eelkõige kopsupõletikuga, kuid ka meningiidi, baktereemia ja uroinfektsioonidega (Podschun & Ullmann, 1998; Hazen et al., 2014).

2.3.2. *Escherichia coli*

E. coli kuulub sugukonda *Enterobacteriaceae* ja perekonda *Escherichia*. See on pulgakujuline Gram-negatiivne bakter, mida tavapäraselt leidub inimeste ja püsisoojaste loomade soolestikus (Tenaillon et al., 2010).

Inimese jaoks tähtsad *E. coli* tüved võib jagada kahte suurde rühma (Russo & Johnson, 2000; Cornelissen et al., 2013):

- Kommensaalsed: esinevad terve inimese seedetrakti normaalses mikrobiotas
- Infektsiooni tekitajad:
 - seedetrakti infektsiooni tekitajad: põhjustavad seedekulglas gastroenteriiti või koliiti.
 - sooleväliste infektsioonide tekitajad: põhjustavad kuseteede infektsioone, ajukelme põletikku ehk meningiiti, kopsupõletikku, osteomüeliiti, kõhukelme põletikku ehk peritoniiti ja pehmete kudede infektsioone.

Kõikide loetletud haigustega võib kaasneda veel baktereemia (Gransden et al., 1990). Näiteks *E. coli* tüved on kõige sagedasemad kuseteede infektsiooni põhjustajad. Kirjanduse andmetel on 70–90% kuseteede infektsioonidest põhjustatud *E. coli* poolt (Flores-Mireles et al., 2015; UPEC projekt, 2015).

2.4. Antibiootikumresistentsus

Antibiootikumid on ühendid, mis hävitavad baktereid (bakteritsiidid) või inhibeerivad nende kasvu (bakteriostaatilised). Antibiootikumid võivad olla looduslikku päritolu või sünteetilised (Bush, 2012). Neid kasutatakse bakteriaalse infektsiooni raviks ja ennetamiseks. Tänapäeva meditsiini suureks probleemiks on bakterite antibiootikumresistentsus, mille leviku põhjuseks on laialdane ja väär antibiootikumide kasutamine (Davies & Davies, 2010; Sedláková et al., 2014). Eriti suureks probleemiks on antibiootikumide väärarbimine arengumaades, kus

vajalikud antibiootikumid pole tihti kättesaadavad ja ravi pole kindlalt reguleeritud (Blomberg, 2008). Samas on antibiootikumresistentsuse levik probleemiks ka Euroopas (Earnshaw et al., 2009). Antimikroobse resistentsuse seire üleeuroopalise võrgustiku (EARS-Net, ingl *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) andmetel on Euroopas põhja-lõuna ning lääne-ida suunalised gradiendid antibiootikumresistentsuses. Kliinilistest materjalidest isoleeritud invasiivseid infektsioone põhjustavad bakterid on resistentsemad antibiootikumidele Lõuna- ja Ida-Euroopas ning tundlikumad Põhja- ja Lääne-Euroopas (ECDC, 2014).

Bakterite ravimresistentsus on antibiootikumide liigkasutuse/väärkasutuse ja nende keskkonda kogunemise möödapääsmatu tagajärg. Kõige levinum on resistentsus β -laktaam-antibiootikumide suhtes. Beeta-laktaamantibiootikume kasutatakse kõige sagedamini infektsioonhaiguste raviks ning bakteri resistentsuse korral võib ravi ebaõnnestuda. Kuna seda antibiootikumide rühma kasutatakse üle 50% ravijuhtudest, siis võib see põhjustada kiiret β -laktaam-resistentsusmehhanismide levikut bakterite vahel (Cornelissen et al., 2013).

2.4.1. Resistentsuse leviku mehhanismid

Horisontaalne geeniülekanne (ingl *horizontal gene transfer*, HGT) on peamine mehhanism, mis põhjustab erinevate ja sama liiki bakterite vahel antibiootikumresistentsete geenide levikut. Bakterite vahelise horisontaalse geeniülekanne tagavad kolm peamist protsessi (Ravi et al., 2014):

- Konjugatsioon: plasmiidide ja transposoonide ülekandumine ühest bakterirakust teise.
- Transformatsioon: eksogeense DNA sisenemine väliskeskkonnast läbi rakumembraani rakku.
- Transduktsioon: bakteriofaagi vahendusel võõrDNA ülekandumine bakterirakku.

2.4.2. Integronid ja antibiootikumresistentsus

Üheks horisontaalse geeniülekanne põhjustajaks on integronid. Integroni järjestusi võib leida bakteri kromosoomide, plasmiidide ja transposoonide koosseisust ja nad saavad geenikassettidest horisontaalse geeniülekanne (järjestus-spetsiifilise rekombinatsioon) teel antibiootikumi resistentsusgeene. Integroni esinemine bakteris võib põhjustada multi-resistentsust erinevatele antibakteriaalsetele preparaatidele (Idrees et al., 2011). Praeguseks on identifitseeritud rohkem kui 60 antibiootikumi resistentsusgeeni erinevate integronide klasside koosseisus (Heir et al., 2004) ning on leitud 130 erinevat geenikasseti, mis on sisenenud

integrone järjestusse (Cambray et al., 2010; Gillings, 2014). Need kassetid põhjustavad resistentsust paljudele antibakteriaalsetele preparaatidele nagu aminoglükosiidid, kinoloonid, β -laktaamid, linkosamiidid, makroliidid, sulfoonamiidid ja mõnede vähemkasutatavatele antibiootikumidele nagu klooramfenikool ja rifampiin. Kõige rohkem on leitud klass 1 integrone antibiootikumresistentsete enterobakterite koosseisust (Rao et al., 2006). Näiteks kliinilistest materjalidest isoleeritud *K. pneumoniae* tüvedest 38% ja *E. coli* tüvedest 72% ja sisaldasid klass 1 integrone ja vastavalt 4% ning 13% klass 2 integrone. Samas suur osa nendest bakteritest olid resistentsed sulfoonamiididele, kuna sisaldasid resistentsusgeene integrone järjestustes (Motakefi et al., 2008). Nii on integronid seotud antibiootikumresistentsuse kiire ja üha laieneva levikuga Gram-negatiivsetes bakterites (Ravi et al., 2014). Integronide esinemine bakteris korreleerub antibiootikumresistentsusega (Leverstein-van Hall et al., 2003; Gillings, 2014). On leitud, et inimest koloniseerivate bakterite vahel toimub horisontaalne geeniülekanne sagedamini kui inimeste normaalses mikrobiotas mitteesinevatel bakteritel (Smillie et al., 2011).

2.4.3. Enterobakterid ja antibiootikumresistentsus

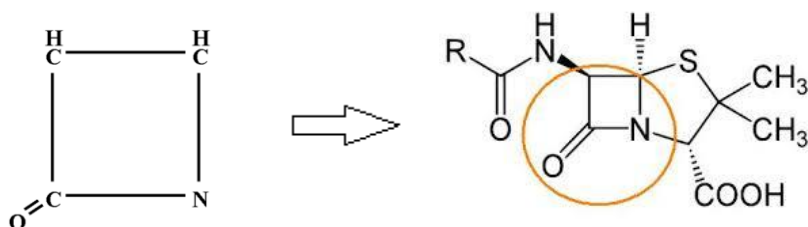
Enterobakterid võivad omada nii kromosomaalset kui plasmiidset ja transposoonset päritolu resistentsust, mis põhjustab kiiret antibiootikumresistentsuse levikut erinevate tüvede ja liikide vahel (Schofield, 2011). Näiteks on enterobakteritel β -laktaamantibiootikumide lõhustavaid ensüüme tootev resistentsusmehhanism, mis võib levida nii kromosomaalsel kui plasmiidisel teel (Türk, 2015). Selline levimisviis põhjustab antibiootikumi resistentsusgeenide kiire ja laialdase leviku kogu keskkonnas (Thomson & Bonomo, 2005). Alates 1990ndatest on β -laktaam-resistentsusmehhanismi omavate *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvate bakterite hulk tõusnud. Need haigustekitajad on osutunud ülemaailmselt suureks probleemiks nii haiglas kui ka väljaspool, mille kiirele levikule on omakorda kaasa aidanud inimeste globaalne reisimine ja migratsioon (Schofield, 2011).

2.5. Beeta-laktaamantibiootikumid

2.5.1. Beeta-laktaamantibiootikumide iseloomustus

Beeta-laktaamantibiootikumid kuuluvad bakteritsiidse toimega antibiootikumide klassi, mida iseloomustab β -laktaamrõnga esinemine (Joonis 3). See struktuur koosneb neljast molekulist (kolm süsiniku ja üks lämmastiku aatom), mille küljes on olenevalt antibiootikumist kas viie või kuue molekuliga heterotsükline rõngas (Bush, 2012). Kõigepealt seondub antibiootikumi

β -laktaamrõngas bakteri pinnal oleva spetsiifilise retseptoriga PBP (ingl *penicillin-binding protein*), seejärel β -laktaamrõngas „avaneb“ ja seondub kovalentselt ensüümiga transspeptidaas. Kuna transpeptidaas on β -laktaamrõngaga seotud, siis on bakteri rakuseina sünteesil vajaliku ensüümi toime blokeeritud ja bakteri rakusein nõrgestatud kuni lõpuks rakk laguneb (Beta-lactam ring action, 2015). (Joonis 2).



Joonis 3. Beeta-laktaamrõngas ja penitsilliini struktuur (Pathogenic Microbiology, 2000; Beta-lactam ring action, 2015).

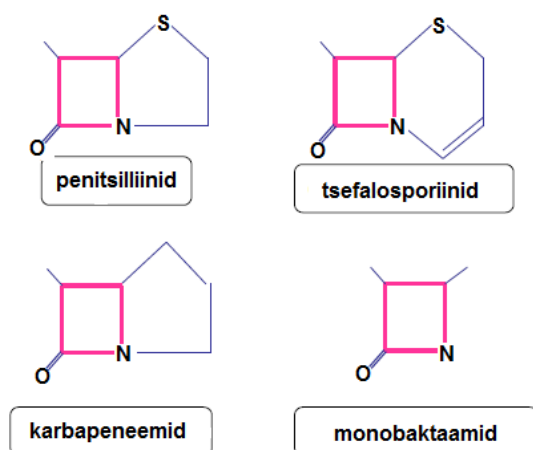
Beeta-laktaamrõnga terviklikkus on vajalik selleks, et antibiootikum oleks võimeline inaktiveerima bakterite transpeptidaase, mis katalüüsivad viimaseid reaktsioone bakteri rakuseina peptidoglükaani sünteesil (Bush, 2012; Medeiros, 1997). Kuna need antibiootikumid on võimelised inhibeerima nii anaeroobsete kui aeroobsete Gram-negatiivsete ja Gram-positiivsete kokkide rakuseina sünteesi, siis on β -laktaamantibiootikumid ühed enimkasutatud antibiootikumid infektsioonhaiguste ravis (Thomson & Bonomo, 2005; Bush, 2012).

2.5.2. Beeta-laktaamantibiootikumide klassifikatsioon

Beeta-laktaamantibiootikumid jagunevad nelja suuremasse rühma (Eskola et al., 2000; Frank & Tacconelli, 2012).

- Penitsilliinid: sisaldavad tiasolidiin- ja β -laktaamrõngast (Joonis 4). Viimane neist on seotud kõrvalahelaga, mille struktuur penitsilliiniderivaatidel varieerub. Penitsilliinid jagunevad looduslikeks ja poolsünteetilisteks. Looduslikud penitsilliinid lõhuvad efektiivselt Gram-positiivsete bakterite rakukesta ja on tundlikud penitsillinaasidele. Poolsünteetilised penitsilliinid toimivad efektiivselt nii Gram-negatiivsete kui ka positiivsete bakterite vastu ning ei ole resistentsed penitsillinaasidele.
- Tsefalosporiinid: jagunevad esimese, teise, kolmanda ja neljanda põlvkonna tsefalosporiinideks antibakteriaalse spektri ulatuse põhjal. Toime ja struktuuri poolest on väga sarnased penitsilliinidele. Kõik tsefalosporiinid toimivad Gram-positiivsete kokkide ja Gram-negatiivsete bakterite vastu, välja arvatud enterokokid.

- Karbapeneemid: selle rühma esindajad imipeneem ja meropeneem on kõige laiema antibakteriaalse toimega β -laktaamantibiootikumid, inhibeerides peaaegu kõiki Gram-negatiivseid ja positiivseid baktereid.
- Monobaktaamid: kõrge efektiivsusega kõikide Gram-negatiivsete bakterite vastu ja nõrga toimega Gram-positiivsete kokkide ja anaeroobide vastu.



Joonis 4. Beeta-laktaamantibiootikumide klassid (Linrong, 2011).

Lisaks β -laktaamantibiootikumidele on olemas β -laktamaase inhibeerivad ühendid nagu klavulaanhape, sulbaktam ja tasobaktam. Beeta-laktaamantibiootikume kasutatakse kombineerituna inhibiitoritega, et muuta antibiootikumi toime efektiivsemaks. Inhibiitorid üksi on nõrga antibakteriaalse toimega (Bush, 2012).

2.6. Laiendatud spektriga β -laktamaas

Laiendatud spektriga β -laktamaas (ingl *extended-spectrum β -lactamase*, ESBL) on bakterite resistentsusmehhanism β -laktaamantibiootikumide vastu. Beeta-laktamaasid on ensüümid, mis lõhustavad antibiootikumi β -laktaamrõnga. Peale β -laktamaaside võivad bakteri antibiootikumresistentsuse põhjustada modifikatsioonid bakterirakuseina ehituses (Medeiros, 1997; Bush, 2012).

2.6.1. Laiendatud spektriga β -laktamaaside klassifikatsioon

Kuna β -laktamaaside hulka kuulub suur grupp ensüüme (üle 1000 erineva), siis on kasutusel erinevad β -laktamaaside klassifikatsioonisüsteemid vastavalt ensüümide hüdrofüütilisele spektrile, geneetilisele lokaliseerimisele (kromosoom või plasmiid), inhibiitori tundlikkusele ja geeni või aminohappe järjestusele (Bush et al., 1995; Bush, 2012). Käesoleval ajal

kasutatakse kahte peamist β -laktamaaside klassifikatsiooni-süsteemi, millele on veel lisandunud kolmas, et lihtsustada kliiniliste laborite tööd:

- Molekulaarne (Ambleri süsteem)
- Funktsionaalne klassifikatsioonisüsteem (Bush-Jacoby-Medeiros süsteem)
- Giske klassifikatsioonisüsteem

Molekulaarne klassifikatsioonisüsteem (Ambleri süsteem)

Ensüümid on jaotatud klassidesse aminohappelise järjestuse sarnasuse põhjal. Klass A, C ja D sisaldavad ensüüme, mis kasutavad seriini antibiootikumide β -laktaamrõnga hüdrolyüsiks. Klassis B on metallo-ensüümid (metallo- β -laktamaasid, MBL-s), mis erinevad oma struktuurilt teistest klassidest, kuna vajavad aktiivsaisid tsinkiooni, et hüdrolyüsida antibiootikumi β -laktaamrõngas. Geene, millelt neid ensüüme kodeeritakse, nimetatakse *bla_{MBL}*-geenid ja need paiknevad bakteri kromosoomis, plasmiidil või integroni järjestuses. Laiendatud spektriga β -laktamaasid kuuluvad klassidesse A ja D. Klass A ensüümid on inhibeeritavad β -laktamaas inhibiitorite poolt ja klass D ensüümidele on β -laktamaasidel nõrgendatud mõju. (Bush et al., 1995; Bush & Jacoby, 2010).

Funktsionaalne klassifikatsioonisüsteem (Bush-Jacoby-Medeiros süsteem)

Klassifikatsioon põhineb ensüümide substraatide ja inhibiitorite profiilidel, kus ühes klassis on sarnase fenotüübiga isolaadid. Selle klassifikatsioonisüsteemi järgi jagunevad β -laktamaasid 4 põhiklassi, mis jagunevad omakorda veel alamklassideks (Bush, 2012; Bush et al., 1995):

Klass 1: tsefalosporinaasid, millele ei mõju β -laktamaaside inhibiitor klavulaanhape. Võrdne molekulaarse klassifikatsioonisüsteemi klass C-ga.

Klass 2: β -laktamaaside, kuhu kuuluvad penitsillinaasid, tsefalosporinaasid ja laiaspektriga β -laktamaasid, mis on tavaliselt inhibeeritud β -laktamaas inhibiitorite poolt. Ühtlasi on see suurim laktamaaside klass. Molekulaarse klassifikatsioonisüsteemi järgi on siin klass A ja D ensüümid.

Klass 3: metallo- β -laktamaasid (MBL), mis hüdrolyüsivad penitsilliine, tsefalosporiine ja karbapeneeme. Metallo- β -laktamaasid on resistentsed β -laktamaasi inhibiitoritele (klavulaanhape, sulbaktaam ja tasobaktaam), välja arvatud raskmetalli kelaatorile (ingl *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) ja p-kloor-elavhõbe-bensoaat (ingl *p-chloromercuribenzoate*, pCMB). Molekulaarse klassifikatsiooni järgi klass B ensüümid.

Klass 4: penitsillinaasid, mis ei ole hästi inhibeeritavad klavulaanhappe poolt. See klass on veel täpsemalt kirjeldamata. Arvatakse, et võiks kuuluda mõne teise eelnimetatud klassi

koosseisu (Bush et al., 1995; Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Schofield, 2011; Bush, 2012).

Giske klassifikatsioonisüsteem

Giske klassifikatsioon on kasutusele võetud teiste klassifikatsioonisüsteemide täiendamiseks. Selle üks eesmärkidest on lihtsustada ensüümide süstematiseerimist kliiniliste laborite, tervishoiutöötajate ja infektsioonikontrolli teostamiseks (Giske, 2009). Giske klassifikatsiooni kohaselt on ensüümid jagatud klassidesse kliinilise tähtsuse järgi. Selle süsteemi järgi jaotuvad ESBL-d kolme põhiklassi:

ESBL_A: see klass sisaldab enam levinud ESBL-de nagu CTX-M, SHV ja TEM perekondade derivaate. ESBL_A on võrdne Ambleri süsteemi klass A ja Bush-Jacoby-Medeiros süsteemi alamklassi 2be-ga (Giske et al., 2009; Bush & Jacoby, 2010).

ESBL_M klass, mis jaotatakse kaheks (Giske, 2009):

- ESBL_{M-C}: plasmiidset päritolu AmpC, mis on võrdne Ambleri süsteemi klass C-ga
- ESBL_{M-D}: ESBL-d perekonnast OXA, mis on võrdne Ambleri süsteemi klass D-ga

ESBL_{CARBA}: siia kuuluvad karbapeneeme hüdrolüüsivad ensüümid ja see klass jaotatakse kolmeks (Giske, 2009):

- ESBL_{CARBA-A}: *K. pneumoniae* klass A karbapenemaas (KPC)
- ESBL_{CARBA-B}: see klass sisaldab metallo-β-laktamaase (MBL)
- ESBL_{CARBA-D}: selle klassi esindajateks on OXA karbapenemaasid

2.6.2. Laiendatud spektriga β-laktamaas ja integronid

Praeguseks on vähe teada integronide ja laiendatud spektriga β-laktamaasi (ESBL) tootvate geenide koeksisteerimisest. ESBL geenid tagavad bakteri resistentsuse β-laktaam antibiootikumidele. On leitud, et integronide esinemissagedus multiresistentsetes enterobakterites on kõrge. Seetõttu peetakse integrone multiresistentsete bakterite markeriteks (Rao et al., 2006; Rizi et al., 2015). Samuti on viimase kümnendi jooksul toimunud kiire ja drastiline ESBL gene sisaldavate enterobakterite sageduse tõus kliinilistes proovides (Karimi et al., 2012, Memariani et al., 2014). Nii arvatakse, et integronid kui horisontaalse geeniülekanne põhjustajad erinevate bakterite vahel, võivad olla ESBL produtseerivate geenide kiire leviku põhjuseks (Memariani et al., 2014). Näiteks on leitud, et 73% haiglast isoleeritud ESBL positiivsetest *K. pneumoniae* tüvedest sisaldas klass 1 integroni (Rao et al., 2006). *E. coli* kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL produtseerivate tüvede korral oli

integronide esinemissagedus 69% (Chen et al., 2013). Veel on teada, et 48% *K. pneumoniae* ja 54% *E. coli* kliinilistest materjalidest eraldatud tüvedest omasid nii ESBL geene kui ka integrone (Karimi et al., 2012). Erinevate kirjandusallikate põhjal on leitud, et kliinilistest materjalidest isoleeritud enterobakterid, mis produtseerivad ESBL-i, omavad suurema tõenäosusega klass 1 integrone (Chen et al., 2013; Mobarak-Qamsari et al., 2013). Samas on mitmeid uuringuid, mille järeldesteks on, et integronide esinemine ja ESBL levik pole omavahel seotud (Machado et al., 2005; Memariani et al., 2014). Nii on antibiootikum-resistentsuse kiire leviku pidurdamiseks vaja oluliselt rohkem uurida integronide tähtsust ESBL geenide levikus.

3. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli uurida integronide esinemist Läänemere riikide (Eesti, Läti, Leedu, Venemaa) inimeste bioloogilistest materjalidest isoleeritud *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli* tüvedes.

Töö alaeesmärgid olid:

1. Kirjeldada ja võrrelda fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes integronide ja integronide klasside esinemist sõltuvalt tüve päritolust (riik, kliiniline materjal).
2. Analüüsida ESBL positiivsetes bakteritüvedes integronide esinemise seoseid bakteriliigi, peremeesorganismi vanuse, päritolu riigi ja kliiniliste materjalidega.
3. Kirjeldada integronide esinemist Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes.
4. Võrrelda integronide esinemist Eesti tervete inimeste soole mikrobiootast ja kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvedes.

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1. Uuringumaterjal

Käesolevas töös uuriti laiendatud spektriga beeta-laktamaase produtseerivaid (ingl *extended spectrum beta-lactamase* ESBL) ja mitteprodutseerivaid enterobaktereid.

ESBL positiivsed tüved

ESBL positiivsed *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüved koguti “Antibiootikumresistentsuse molekulaarne multipleks diagnostika” (ARMMD) projekti raames. Tüved koguti vahemikus jaanuarist maini 2012. aastal 20 erinevast haiglast Läänemere riikides: Eestis (n=5), Lätis (n=4), Leedus (n=3) ja Venemaal (Peterburg) (n=8). Fenotüübilise ESBL kindlaks tegemiseks skriiniti uuringu käigus kokku 13 130 tüve: 2350 *K. pneumoniae* ja 10780 *E. coli*. Baltimaades skriiniti kliinilistest materjalidest isoleeritud tüved vastavalt antimikroobse tundlikkuse testimise Euroopa komitee (ingl *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST 2.0) ja Venemaal vastavalt kliiniliste ja laboratoorsete standardite instituudi (ingl *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI 2011) kriteeriumitele. Pärast skriiningut kasutati ESBL produktsiooni kinnitamiseks diskdifusiooni meetodil põhinevat ESBL määramise komplekti (ESBL ja AmpC Confirm kit; Rosco, Taani). Fenotüübiliselt ESBL positiivsed tüved saadeti Tartu Ülikooli mikrobioloogia instituuti. Uuringu käigus registreeriti kodeeritud patsientide andmed.

Käesolevas töös uuriti ARMMD projekti käigus skriinitud 531 *K. pneumoniae* ja 422 *E. coli* fenotüübiliselt ESBL positiivset bakteritüve, mis olid isoleeritud erinevatest kliinilistest materjalidest (veri, uriin, hingamisteede ja haavaeritis) Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal (Tabel 1).

ESBL negatiivsed tüved

ESBL negatiivsed *E. coli* tüved (n=352) isoleeriti Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) kliinilistest materjalidest ajavahemikul 2006–2012 (Tabel 1). Neist 117 *E. coli* tüve isoleeriti bakterieemiaga patsientide verest (veebruar 2006–detsember 2007) ja 105 *E. coli* tüve uroinfektsiooniga patsientide uriinist (september–november 2011) ja 130 *E. coli* tüve isoleeriti tervete inimeste soole mikrobiotast (mai–detsember 2012) projekti “Antibiootikumresistentsuse levikuteed” (ABRESIST) käigus.

Kõiki kogutud tüvesid (ESBL positiivsed ja negatiivsed) säilitatakse Tartu Ülikooli mikrobioloogia instituudi Inimese Mikrobiota Biopangas (HUMB) -80°C juures.

Tabel 1. Käesolevas töös kasutatud ESBL positiivsete *K. pneumoniae* ja *E. coli* ning ESBL negatiivsete *E. coli* tüvede päritolu kirjeldus (n, %)

Materjal	Eesti		Läti		Leedu		Venemaa		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i> ESBL positiivsed tüved										
Veri	6	3,2	5	7,4	15	15,3	7	3,9	33	6,2
Uriin	121	65,4	26	38,2	49	50,0	32	40,6	269	50,7
Hingamisteed	37	20,0	19	27,9	12	12,2	68	37,7	136	25,6
Mäda	21	11,4	18	26,5	22	22,5	73	17,8	93	17,5
Kokku	185	100,0	68	100,0	98	100,0	180	100,0	531	100,0
<i>E. coli</i> ESBL positiivsed tüved										
Veri	7	4,8	8	7,2	7	20,0	5	3,9	27	6,4
Uriin	107	73,3	52	46,4	19	54,3	86	66,6	264	62,6
Hingamisteed	9	6,2	15	13,4	2	5,7	13	10,1	39	9,2
Mäda	23	15,7	37	33,0	7	20,0	25	19,4	92	21,8
Kokku	146	100,0	112	100,0	35	100,0	129	100,0	422	100,0
<i>E. coli</i> ESBL negatiivsed tüved										
Veri	117	33,2	–	–	–	–	–	–	–	–
Uriin	105	29,7	–	–	–	–	–	–	–	–
Roe	130	36,9	–	–	–	–	–	–	–	–
Kokku	352	100,0	–	–	–	–	–	–	–	–

4.2. Uuringumetoodika

Bakteritüvede identifitseerimine

Bakteriliik identifitseeriti Tartu Ülikooli mikrobioloogia instituudis MALDI-TOF analüsaatori (Bruker Daltonics GmbH, Saksamaa) abil. Tüved külvati mitteselektiivsele veriagarile (Lab M; UK) ja inkubeeriti ööpäev 37°C juures. Seejärel identifitseeriti tüved MALDI-TOF spektromeetriga vastavalt tootjaprotokollile. Meetod põhineb bakteriliigi kindlaks tegemisel bakteriliigile iseloomulike valkude spektri põhjal.

DNA eraldamine

Käesoleva töö raames külvati *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüved veriagarile ja inkubeeriti ööpäev 37°C juures. Seejärel eraldati väljakasvanud kolooniatest bakterite DNA QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Saksamaa) abil vastavalt tootjaprotokollile.

Integraasi geenide määramine multipleks RT PCR meetodiga

Multipleks reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooniga (ingl *real-time polymerase chain reaction*, RT PCR) määrati kindlaks *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes integraasi geenide olemasolu. Multipleks RT PCR-i reaktsioonides kasutati kolme erinevat integraasi geeni praimerit (Barraud et al., 2010) (Tabel 2.) Selleks valmistati 25 µl reaktsioonisegu iga proovi jaoks. Reaktsioonisegu sisaldas 5 µl bakteriaalset DNA-d, 12,5 µl TaqMan universal master mix-i (Applied Biosystem, USA), 6mM MgCl₂; 0,4 µM igat praimerit (int1-(LC1-LC5), (int2-(LC2-LC3), (int3-(LC1-LC2) ja 0,2 µM igat proobi (int1, int2, int3) (Barraud et al., 2010). RT PCR programm sisaldas kolme etappi:

1. etapp 95°C juures 10 min: esialgne denaturatsioon
2. etapp 95°C juures 30 sekundit denaturatsioon ja 60°C juures 1 minut praimerite seondumine – 45 tsüklit
3. DNA süntees 72°C juures 10 sekundit

RT PCR viidi läbi 7500 Real-time PCR termotsükleriga (Applied-Biosystem, USA). Kõiki standardi lahjendusi ja proove amplifitseeriti kolmes korduses ja positiivne kontroll lisati igale RT PCR plaadile. Positiivseteks kontrollideks olid *E.coli/pBAD 18::intI1*, *E.coli/pGEMT Easy::intI2* ja *E.coli/pBAD18::intI* tüved (Barraud, Department of Bacteriology, University of Limnoges, France). Kõikide proovide RT PCR tulemusi analüüsiti 7500 Software versioon 2.0.4 programmi poolt.

Käesoleva töö autor viis läbi DNA eraldamise ja integraasi geenide määramise loetletud ESBL positiivsete *K. pneumoniae* ja *E. coli* ning ESBL negatiivsete *E. coli* bakteritüvede korral.

Tabel 2. Integraasi geenide detekteerimiseks kasutatud praimerid ja proovid (Barraud et al., 2010)

Geen*	Praimeri nimi	Järjestus 5'–3' suunas
<i>intI1</i>	intI1-LC1	GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG
	intI1-LC5	GAT CGG TCG AAT GCG TGT
<i>intI2</i>	intI2-LC2	TGC TTT TCC CAC CCT TAC C
	intI2-LC3	GAC GGC TAC CCT CTG TTA TCT C
<i>intI3</i>	intI3-LC1	GCC ACC ACT TGT TTG AGG A
	intI3-LC2	GGA TGT CTG TGC CTG CTT G
<i>intI1</i>	intI1-probe	ATT CCT GGC CGT GGT TCT GGG TTT T
<i>intI2</i>	intI2-probe	TGG ATA CTC GCA ACC AAG TTA TTT TTA CGC TG
<i>intI3</i>	intI3-probe	CGC CAC TCA TTC GCC ACC CA

* Integraasi geen, millele praimer seondub.

4.3. Töös kasutatud tunnused

- Integronide esinemine: jah/ei
- Integronide klassid: Integron 1 (Int1), Integron 2 (Int2), Integron 3 (Int3) (esinemine kas üksi või kombinatsioonis)
- Integronide klasside kombinatsioonid: Int1/Int2, Int1/Int3, Int2/Int3, Int1/Int2/Int3
- ESBL *K. pneumoniae* tüved: positiivne
- ESBL *E. coli* tüved: positiivne/negatiivne
- Riik: Eesti / Läti / Leedu / Venemaa
- Vanus: patsientide vanus aastates, kellelt proovid koguti
- Bioloogiline materjal:
 - ✓ Kliiniline materjal hospitaliseeritud patsientidelt: veri / uriin / hingamisteede (ülemised ja alumised) eritis / haavaeritis
 - ✓ Normaalne mikrobiota tervete inimeste soolest: roe

4.4. Andmeanalüüs

Andmeanalüüs viidi läbi *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedele eraldi (Tabel 1). Andmete kirjeldamiseks kasutati sagedustabeleid. Arvutati välja proove andnud uuringualuste keskmised vanused koos standardhällbega (ingl *standard deviation*, SD). Kahe rühma vahelise erinevuse testimiseks kasutati z-testi. Rohkem kui kahe rühma vahelise erinevuse testimiseks kasutati kas hii-ruut testi või Fisher exact testi. Kahe rühma keskväärtuste võrdlemiseks kasutati Mann-Whitney U-testi.

Integronide esinemise seoseid erinevate teguritega (bakteriliik, inimese vanus, päritoluriik, uuritav materjal) uuriti logistilise regressioonanalüüsiga. Logistilise regressioonanalüüsi I mudelis analüüsiti ESBL positiivseid *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvesid Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal, mis olid isoleeritud kliinilistest materjalidest (veri, uriin, hingamisteede ja haavaeritis). II mudelis analüüsiti ESBL positiivseid ja negatiivseid *E. coli* tüvesid, mis olid isoleeritud kliinilistest materjalidest (veri, uriin) Eestis. Mõlemas mudelis oli sõltuvaks teguriks integronide esinemine (vs mitte esinemine). I mudelis olid kirjeldavateks teguriteks bakteriliik (*K. pneumoniae*, *E. coli*), inimese vanus (pideva tunnusena), riik (Eesti, Läti, Leedu, Venemaa) ja kliiniline materjal (veri, uriin, hingamisteede ja haavaeritis). II mudelis olid kirjeldavateks teguriteks bakteritüvi (ESBL positiivne, ESBL negatiivne) ja kliiniline materjal (veri, uriin). Mõlemas mudelis arvutati välja kohandamata ja kõigile mudelis kasutatud kirjeldavatele teguritele kohandatud šansisuhted (OR) koos 95% usaldusvahemikuga (95% CI).

Integronide esinemise võrdlemiseks normaalse mikrobiota tüvedes (roe) ning kliinilistest materjalidest (veri, uriin) isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes Eestis arvutati välja integronide esinemissagedus erinevates materjalides koos 95% usaldusvahemikega.

Andmeanalüüsiks kasutati statistikaprogrammi STATA 10.0.

5. TULEMUSED

Patsientide vanuseline jaotus

Patsientide vanus, kellelt isoleeriti ESBL positiivsed *K. pneumoniae* ja *E.coli* tüved, oli oluliselt madalam Venemaal võrreldes Eesti, Läti ja Leeduga (Tabel 3).

Tabel 3. Patsientide keskmine vanus koos standardhälbega (SD), kelle kliinilistest materjalidest isoleeriti ESBL positiivsed *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüved (paksus kirjas märgitud erinevused kõigi teiste riikidega)

Keskmine vanus vanus ±SD				
Eesti	Läti	Leedu	Venemaa	Kokku
<i>K. pneumoniae</i>				
65,2±17,1 ^{1,2}	56,4±24,8 ^{1,3,4}	69,1±12,9 ^{3,5}	46,0±30,2^{2,4,5}	59,2 ±23,9 ⁹
<i>E.coli</i>				
58,9±22,6 ⁶	59,3±19,8 ⁸	59,9±25,0 ⁷	29,2±32,3^{6,7,8}	52,5±27,5 ⁹

¹p=0,015; ²p<0,001; ³p<0,001; ⁴p=0,041; ⁵p<0,001; ⁶p<0,001; ⁷p<0,001; ⁸p<0,001; ⁹p<0,001;

5.1. Integronide esinemine ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* bakteritüvedes Läänemere riikides

5.1.1. Integronide esinemine riigiti ja vastavalt kliinilisele materjalile

Eestis, Lätis, Leedus ja Venemaal kokku oli integrone kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes 92,3% (490/531) ja *E. coli* tüvedes 98,3% (415/422) (p<0,001) (Tabel 4).

Eestist kogutud *E. coli* tüvedes oli rohkem integrone kui *K. pneumoniae* tüvedes (98,0% vs 90,8%; p=0,007) (Tabel 4). Lätist, Leedust ja Venemaalt isoleeritud ESBL positiivsetel *K.pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes ei olnud erinevusi integronide esinemissageduses liikide vahel (p=0,298; p=0,067; p=0,156).

Riikidevahelises võrdluses oli Leedust isoleeritud fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes vähem integrone võrreldes Lätiga (p=0,015) ja Venemaaga (p=0,004) (Tabel 4). Fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes riikidevahelisi erinevusi ei olnud (p=0,723).

Tabel 4. Integronide esinemine ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes riigiti

Integroni esinemine	Eesti		Läti		Leedu		Venemaa		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i>										
Integron+	168	90,8 ¹	66	97,1 ²	84	85,7 ^{2,3}	172	95,6 ³	490	92,3 ⁴
Integron–	17	9,2	2	2,9	14	14,3	8	4,4	41	7,7
Kokku	185	100,0	68	100,0	98	100,0	180	100,0	531	100,0
<i>E. coli</i>										
Integron+	143	98,0 ¹	111	99,1	34	97,1	127	98,5	415	98,3 ⁴
Integron–	3	2,0	1	0,9	1	2,9	2	1,5	7	1,7
Kokku	146	100,0	112	100,0	35	100,0	129	100,0	422	100,0

¹p=0,007; ²p=0,01; ³p=0,004; ⁴p<0,001;

K. pneumoniae

Kõikides riikides kokku esines integrone fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes vastavalt kliinilisele materjalile 93,9% veres, 91,8% uriinis, 89,7% hingamisteedes ja 96,8% haavaeritises (p=0,238) (Tabel 5).

Riigiti varieerus integronide esinemine ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* bakteritüvedes erinevates kliinilistes materjalides vahemikus 80–100% (Tabel 5).

Riikidevahelises võrdluses oli fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* bakteritüvedes erinevused integronide esinemises vaid uriinis ja hingamisteede eritises (Tabel 5). Leedus uriinist isoleeritud tüvedes oli oluliselt vähem integrone võrreldes Läti (p=0,016) ja Venemaaga (p=0,012). Eestis hingamisteedest isoleeritud tüvedes oli oluliselt vähem integrone võrreldes Venemaaga (p=0,043).

Tabel 5. Integronide esinemine (Int+, Int-) ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes vastavalt kliinilisele materjalile riigiti

Integronide esinemine riigiti	Kliiniline materjal									
	Veri		Uriin		Hingamisteed		Haavaeritis		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Riigid koos										
Int+	31	93,9	247	91,8	122	89,7	90	96,8	490	92,3
Int-	2	6,1	22	8,2	14	10,3	3	3,2	41	7,7
Kokku	33	100,0	269	100,0	136	100,0	93	100,0	531	100,0
Eesti										
Int+	6	100,0	111	91,7	30	81,1 ³	21	100,0	168	90,8
Int-	0	0,0	10	8,3	7	18,9	0	0,0	17	9,2
Kokku	6	100,0	121	100,0	37	100,0	21	100,0	185	100,0
Läti										
Int+	5	100,0	26	100,0 ¹	17	89,5	18	100,0	66	97,1
Int-	0	0,0	0	0,0	2	10,5	0	0,0	2	2,9
Kokku	5	100,0	26	100,0	19	100,0	18	100,0	68	100,0
Leedu										
Int+	13	86,7	40	81,6 ^{1,2}	11	91,7	20	90,9	84	85,7
Int-	2	13,3	9	18,4	1	8,3	2	9,1	14	14,3
Kokku	15	100,0	49	100,0	12	100,0	22	100,0	98	100,0
Venemaa										
Int+	7	100,0	70	95,9 ²	64	94,1 ³	31	96,9	172	95,6
Int-	0	0,0	3	4,1	4	5,9	1	3,1	8	4,4
Kokku	7	100,0	73	100,0	68	100,0	32	100,0	180	100,0

¹p=0,016; ²p=0,012; ³p=0,043;

E. coli

Kõikides riikides kokku esines integrone fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes vastavalt materjalile 96,3% veres, 99,2% uriinis, 97,4% hingamisteedes ja 96,7% haavaeritises (p=0,131) (Tabel 6).

Riigiti varieerus integronide esinemine ESBL positiivsetes *E. coli* bakteritüvedes erinevates kliinilistes materjalides vahemikus 85–100% (Tabel 6).

Riikidevahelises võrdluses ei olnud integronide esinemises erinevusi materjalide vahel fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *E. coli* bakteritüvedes ($p=0,572$) (Tabel 6).

Tabel 6. Integronide esinemine (Int+, Int-) ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes vastavalt kliinilisele materjalile riigiti

Integronide esinemine riigiti	Kliiniline materjal									
	Veri		Uriin		Hingamisteed		Haavaeritis		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Riigid koos										
Int+	26	96,3	262	99,2	38	97,4	89	96,7	415	98,3
Int-	1	3,7	2	0,8	1	2,6	3	3,3	7	1,7
Kokku	27	100,0	264	100,0	39	100,0	92	100,0	422	100,0
Eesti										
Int+	6	85,7	106	99,1	9	100,0	22	95,7	143	98,0
Int-	1	14,3	1	0,9	0	0,0	1	4,4	3	2,1
Kokku	7	100,0	107	100,0	9	100,0	23	100,0	146	100,0
Läti										
Int+	8	100,0	51	98,1	15	100,0	37	100,0	111	99,1
Int-	0	0,0	1	1,9	0	0,0	0	0,0	1	0,9
Kokku	8	100,0	52	100,0	15	100,0	37	100,0	112	100,0
Leedu										
Int+	7	100,0	19	100,0	2	100,0	6	85,7	34	97,1
Int-	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	14,3	1	2,9
Kokku	7	100,0	6	100,0	2	100,0	20	100,0	35	100,0
Venemaa										
Int+	5	100,0	86	100,0	12	92,3	24	96,0	127	98,5
Int-	0	0,0	0	0,0	1	7,7	1	4,0	2	1,6
Kokku	5	100,0	86	100,0	13	100,0	25	100,0	129	100,0

Riikides kokku oli integronide esinemise erinevus fenotüübiliselt ESBL positiivsetes tüvedes liigiti ainult uriinis. Uriinist isoleeritud *E. coli* tüvedes oli oluliselt rohkem integrone võrreldes *K. pneumoniae* tüvedega ($p<0,001$).

5.1.2. Integronide klasside esinemine riigiti ja vastavalt kliinilisele materjalile

Tabel 7 kirjeldab klass 1, 2 ja 3 integronide esinemissagedust kas üksi või kombinatsioonis, mis on välja arvatud tabel 7a andmetel.

K. pneumoniae

Klass 1 integrone (kas üksi või kombinatsioonis) esines 89,3% *K. pneumoniae* ESBL positiivsetes tüvedes Eestis, 98,5% Lätis, 78,6% Leedus ja 94,2% Venemaal (Tabel 7). Leedust isoleeritud tüvedes oli integrone oluliselt vähem võrreldes Eesti, Läti ja Venemaaga ($p=0,022$; $p<0,001$; $p<0,001$).

Klass 2 integrone esines fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes Eestis 4,2%, Lätis 1,5%, Leedus 11,9% ja Venemaal 3,5%. (Tabel 7). Leedust isoleeritud tüvedes oli oluliselt rohkem klass 2 integrone võrreldes Eesti, Läti ja Venemaaga ($p=0,021$; $p=0,015$; $p=0,009$).

Klass 3 integrone (kas üksi või kombinatsioonis) esines fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes Eestis 67,3%, Lätis 1,5%, Leedus 41,7% ja Venemaal 75,0% (Tabel 7). Eestist isoleeritud tüvedes oli oluliselt rohkem klass 3 integrone võrreldes Läti ja Leeduga ($p<0,001$; $p<0,001$), Leedust isoleeritud tüvedes oluliselt rohkem võrreldes Lätiga ($p<0,001$), kuid vähem võrreldes Venemaaga ($p<0,001$) ja Lätist isoleeritud tüvedes oli klass 3 integrone vähem võrreldes teiste riikidega ($p<0,001$).

E. coli

Klass 1 integrone (kas üksi või kombinatsioonis) esines 100,0% *E. coli* ESBL positiivsetes tüvedes Eestis, Lätis ja Leedus ning 98,4% Venemaal (Tabel 7). Klass 1 esinemises *E. coli* ESBL positiivsetes tüvedes ei olnud riikidevahelisi erinevusi ($p=0,573$).

Klass 2 integrone (kas üksi või kombinatsioonis) esines fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes Eestis 7,0%, Lätis 3,6%, Leedus 2,9% ja Venemaal 17,3% (Tabel 7). Venemaalt isoleeritud tüvedes esines klass 2 integrone oluliselt rohkem võrreldes Eesti, Läti ja Leeduga ($p=0,009$; $p=0,001$; $p=0,033$).

Klass 3 integrone esines 82,5% ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes Eestis, 44,1% Lätis, 11,8% Leedus ja 55,1% Venemaal (Tabel 7). Eestist isoleeritud tüvedes oli oluliselt rohkem klass 3 integrone võrreldes Läti ($p<0,001$), Leedu ($p<0,001$) ja Venemaaga ($p<0,001$) ning Leedust isoleeritud tüvedes oli oluliselt vähem klass 3 integrone võrreldes Eesti, Läti ja Venemaaga ($p<0,001$; $p=0,001$; $p<0,001$).

Tabel 7. Integronide esinemine klasside järgi (üksik+kombinatsioonis) ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* bakteritüvedes riigiti (rasvases kirjas märgitud erinevused kõigi teiste riikidega)

Int	Eesti		Läti		Leedu		Venemaa		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i>										
Int1	150	89,3 ^{1,2}	65	98,5 ^{1,3}	66	78,6 ^{2,3,4}	162	94,2 ⁴	443	90,4
Int2	7	4,2 ⁵	1	1,5 ⁶	10	11,9 ^{5,6,7}	6	3,5 ⁷	24	4,9
Int3	113	67,3 ^{8,9}	1	1,5 ^{8,10,11}	35	41,7 ^{9,10,12}	129	75,0 ^{11,12}	278	56,7
<i>E. coli</i>										
Int1	143	100,0	111	100,0	34	100,0	125	98,4	413	99,5
Int2	10	7,0 ¹³	4	3,6 ¹⁴	1	2,9 ¹⁵	22	17,3 ^{13,14,15}	37	8,9
Int3	118	82,5 ^{16,17,18}	49	44,1 ^{16,19}	4	11,8 ^{17,19,20}	70	55,1 ^{18,20}	241	58,1

¹p=0,020; ²p=0,022; ³p<0,001; ⁴p<0,001; ⁵p=0,021; ⁶p=0,015; ⁷p=0,009; ⁸p<0,001; ⁹p<0,001; ¹⁰p<0,001; ¹¹p<0,001; ¹²p<0,001; ¹³p<0,009; ¹⁴p=0,001; ¹⁵p=0,033; ¹⁶p<0,001; ¹⁷p<0,001; ¹⁸p<0,001; ¹⁹p=0,001; ²⁰p<0,001;

Fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes esines kõige enam **Int1/Int3** kombinatsiooni (Tabel 7a). ESBL positiivsetest *K. pneumoniae* tüvedes oli antud kombinatsiooni Eestis 53,6%, Leedus 19,1% ja Venemaal 65,7%. Läti Int1/Int3 kombinatsioon puudus. Eestist isoleeritud tüvedes oli Int1/Int3 kombinatsiooni oluliselt rohkem võrreldes Leedu (p<0,001) ja Venemaaga (p=0,023) ning Leedust isoleeritud tüvedes oluliselt vähem võrreldes Venemaaga (p<0,001).

Eestist isoleeritud *E. coli* tüvedes oli eelpool nimetatud kombinatsiooni sagedamini kui Lätist, Leedust ja Venemaalt isoleeritud tüvedes (76,9% , 44,1%, 11,8%, 46,5%; vastavalt p<0,001, p<0,001, p<0,001) (Tabel 7a). Leedust isoleeritud *E. coli* tüvedes oli Int1/Int3 kombinatsiooni vähem võrreldes Eesti, Läti (p=0,001) ja Venemaaga (p<0,001).

Erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüves integroni klassides statistilisi erinevusi ei olnud (tulemusi töös ei esitatud).

Tabel 7a. Integronide esinemine klasside ja klassikombinatsioonide järgi ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* bakteritüvedes riigiti

Integronid	Eesti		Läti		Leedu		Venemaa		Kokku	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i>										
Int1 (ainult)	53	31,5	64	97,0	41	48,8	43	25,0	201	41,0
Int2 (ainult)	0	0,0	0	0,0	1	1,2	0	0,0	1	0,2
Int3 (ainult)	18	10,7	1	1,5	17	20,2	10	5,8	46	9,4
Int1/Int2	2	1,2	1	1,5	7	8,3	0	0,0	10	2,0
Int1/Int3	90	53,6 ^{1,2}	0	0,0	16	19,1 ^{1,3}	113	65,7 ^{2,3}	219	44,7
Int2/Int3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Int1/Int2/Int3	5	3,0	0	0,0	2	2,4	6	3,5	13	2,7
Kokku	168	100,0	66	100,0	84	100,0	172	100,0	490	100,0
<i>E. coli</i>										
Int1 (ainult)	23	16,1	58	52,3	29	85,3	45	35,4	155	37,4
Int2 (ainult)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,8	1	0,2
Int3 (ainult)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,8	1	0,2
Int1/Int2	2	1,4	4	3,6	1	2,9	11	8,6	18	4,3
Int1/Int3	110	76,9 ^{4,5,6}	49	44,1 ^{4,7}	4	11,8 ^{5,7,8}	59	46,5 ^{6,8}	222	53,5
Int2/Int3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Int1/Int2/Int3	8	5,6	0	0,0	0	0,0	10	7,9	18	4,4
Kokku	143	100,0	111	100,0	34	100,0	127	100,0	415	100,0

¹p<0,001; ²p=0,023; ³p<0,001; ⁴p<0,001; ⁵p<0,001; ⁶p<0,001; ⁷p=0,001; ⁸p<0,001;

5.2. Integronide esinemise seosed ESBL positiivsetes bakteritüvedes bakteriliigi, inimese vanuse, riigi ja kliiniliste materjalidega

Kohandamata mudelis oli võrreldes ESBL positiivsete *K. pneumoniae* tüvedega integronide esinemise tõenäosus oluliselt suurem *E. coli* tüvedes (Tabel 8). Võrreldes Eestiga oli integronide esinemise tõenäosus ESBL positiivsetes bakteritüvedes oluliselt suurem Lätis. Vanuse kasvades vähenes integronide esinemise tõenäosus.

Pärast šansisuhte kohandamist kõigile teguritele jäi statistiliselt oluliseks vaid seos bakteriliigiga. Võrreldes ESBL positiivsete *K. pneumoniae* tüvedega oli 3,88 korda suurem šanss (95% CI 1,58–9,50) integronide esinemiseks *E. coli* tüvedes. Integronide esinemise

tõenäosusel ei leitud seost vanuse, riigi ega kliiniliste materjalidega, kust tüved olid isoleeritud.

Tabel 8. Integronide esinemise (vs mitteesinemine) šansisuhted (OR) koos 95% usaldusvahemikuga (CI) bakteriliigi, vanuse, riigi, kliiniliste materjalide järgi ESBL positiivsetes bakteritüvedes (I mudel)

Tunnus	Kohandamata OR (95% CI)	Kohandatud* OR (95% CI)
Bakteriliik		
<i>K. pneumoniae</i>	1	1
<i>E. coli</i>	4,96 (2,20–11,17)	3,88 (1,58–9,50)
Vanus	0,98 (0,97–0,99)	0,99 (0,98–1,01)
Riik		
Eesti	1	1
Läti	3,79 (1,11–12,95)	2,85 (0,91–10,03)
Leedu	0,51 (0,25–1,02)	0,56 (0,27–1,17)
Venemaa	1,92 (0,89–4,18)	1,83 (0,74–4,51)
Kliiniline materjal		
veri	1	1
uriin	1,12 (0,33–3,82)	0,83 (0,23–2,98)
hingamisteed	0,56 (0,16–2,01)	0,43 (0,11–1,67)
mäda	1,57 (0,38–6,48)	0,99 (0,98–1,01)

*Iga šansisuhe kohandati kõigile tabelis esitatud tunnustele.

5.3. Integronide esinemine Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes

ESBL positiivsetes tüvedes esines integrone 98,3% (112/114) proovidest ja ESBL negatiivsetes tüvedes 98,7% (219/222) proovidest Eestis ($p=0,773$) (Tabel 9). Verest isoleeritud ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes esines integrone 85,7% ja ESBL negatiivsetes tüvedes 97,4% ($p=0,088$). Uriinist isoleeritud ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes oli integrone 99,1% ja ESBL negatiivsetes tüvedes 100,0% ($p=0,989$).

Tabel 9. Integronide esinemine (n, %) Eesti ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* bakteritüvedes vastavalt kliinilisele materjalile

Integronid ESBL tüvedes	Veri		Uriin		Kokku	
	n	%	n	%	n	%
ESBL positiivne tüvi						
Int+	6	85,7	106	99,1	112	98,3
Int–	1	14,3	1	0,9	2	1,7
Kokku	7	100,0	107	100,0	114	100,0
ESBL negatiivne tüvi						
Int+	114	97,4	105	100,0	219	98,7
Int–	3	2,6	0	0,0	3	1,3
Kokku	117	100,0	105	100,0	222	100,0

Klass 1 integrone (nii üksi kui kombinatsioonis) esines 100,0% *E. coli* ESBL positiivsetes ja 97,3% ESBL negatiivsetes tüvedes ($p=0,269$) (Tabel 10). **Klass 2** integrone esines vastavalt 1,8% ja 2,3% *E. coli* tüvedes ($p=0,766$). **Klass 3** integrone esines 83,0% *E. coli* ESBL positiivsetes ja 77,6% (170/219) ESBL negatiivsetes tüvedes ($p=0,249$).

Kombinatsioonidest esines kõige rohkem **Int1/Int3** 76,8% *E. coli* ESBL positiivsetes ja 72,6% ESBL negatiivsetes tüvedes ($p=0,412$).

Tabel 10. Integronide klassi esinemine (nii üksi kui kombinatsioonis) (n, %) Eesti ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* bakteritüvedes

Integronid	ESBL positiivne		ESBL negatiivne	
	n	%	n	%
Int 1	112	100,0	213	97,3
Int 2	2	1,8	5	2,3
Int 3	93	83,0	170	77,6

Kohandamata ja kohandatud šansisuhted näitasid, et ei olnud erinevust integronide esinemise tõenäosuses ESBL positiivsete ja negatiivsete *E. coli* bakteritüvede ega kliinilisest materjalist vere ja uriini vahel (Tabel 11).

Tabel 11. Integronide esinemise (vs mitte esinemine) šansisuhted (OR) koos 95% usaldusvahemikuga (95% CI) ESBL positiivsete ja negatiivsete *E. coli* bakteritüvede ja kliinilise materjali järgi Eestis (II mudel)

Tunnus	Kohandamata OR (95% CI)	Kohandatud OR* (95% CI)
ESBL bakteritüvi		
negatiivne	1	1
positiivne	0,77 (0,13–4,66)	0,13 (0,02–1,18)
Kliiniline materjal		
veri	1	1
uriin	7,03 (0,78–63,65)	8,07 (0,80–81,7)

*Šansisuhted kohandati mõlemale tabelis esitatud tunnusele.

5.4. Integronide esinemine Eesti tervete inimeste soole mikrobiotast ja kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvedes

Normaalse mikrobioota tüvedes (roe) oli integrone 26,2% proovidest (Tabel 12). Kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL positiivsetes tüvedes 98,6% ja ESBL negatiivsetes tüvedes 98,7% proovidest. Võrreldes ESBL positiivsete ja negatiivsete tüvedega oli normaalse mikrobioota tüvedes esinev integronide hulk statistiliselt oluliselt väiksem ($p < 0,001$; $p < 0,001$).

Tabel 12. Integronide esinemine normaalse mikrobioota (roe) tüvedes ning ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes Eestis

Materjal	Mikroobitüved n	Integrone sisaldavad proovid		
		n	%	95% CI
Roe	130	34	26,2 ^{1,2}	18,8–34,6
ESBL+ tüved	114	112	98,3 ¹	94,8–99,8
ESBL– tüved	222	219	98,7 ²	96,1–99,7

¹ $p < 0,001$; ² $p < 0,001$;

6. ARUTELU

Käesolevas magistritöös uuriti integronide esinemist patsientide kliinilistest materjalidest ja tervete inimeste soole mikrobiotast isoleeritud *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes.

Integronide epidemioloogia Läänemere riikidest isoleeritud ESBL positiivsetes enterobakterites. Kõikides Läänemere riikides kokku oli integronide esinemissagedus kõrge nii kliinilistest materjalidest isoleeritud fenotüübiliselt ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* kui *E. coli* tüvedes (vastavalt üle 92% ja 98% sisaldas integrone). Ka kirjanduse andmetel oli kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvedes integronide esinemissagedus ESBL positiivsetes enterobakterites kõrge (48–73%) (Rao et al., 2006; Karimi et al., 2012; Chen et al., 2013). Kuna tegemist oli kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL resistentsete tüvedega, siis on mõisteta, et need sisaldasid suures hulgas antibiootikumresistentsust põhjustavaid integrone. Infektsioone põhjustavad tüved on sageli multiresistentsed, mida võivad põhjustada integronide järjestustes esinevad resistentsusgeenid (Kumar et al., 2011). Erinevate teadusuuringute tulemusena on leitud, et integrone võiks kasutada multiresistentsusmarkeritena (Barraud et al., 2010; Gillings, 2014; Kargar et al., 2014; Ravi et al., 2014). Kuna multiresistentsed infektsioone tekitavad tüved ja integronide esinemissagedus on omavahel seotud, siis on see üheks seletuseks infektsioone tekitavate ESBL positiivsete *K. pneumoniae* ja *E. coli* kõrgele integronide sisaldusele.

Läänemere riikides oli ESBL positiivsetes tüvedes integrone rohkem *E. coli* kui *K. pneumoniae* tüvedes, mis oli oluliselt erinev vaid Eestis. See tulemus on kooskõlas rahvusvaheliste teadusuuringutega, kus on analoogiliselt leitud, et *E. coli* sisaldab rohkem integrone kui *K. pneumoniae* (Motakefi et al., 2008; Brolund et al., 2010). Üheks selle põhjenduseks võib olla *E. coli* kõrgem virulentsus võrreldes *K. pneumoniae*'ga (Vernet et al., 1995). Antud töös oli ESBL positiivsetes *E. coli* tüvedes integronide esinemissagedus sarnane erinevates riikides ja kliinilistes materjalides. *K. pneumoniae* tüvedes olid integronide esinemises olulised riikidevahelised erinevused: Leedust isoleeritud tüvedes oli vähem integrone võrreldes Läti ja Venemaaga. Samasugused erinevused olid Leedust isoleeritud urotüvedel, mida võib põhjendada sellega, et urotüved sisaldavad kõige enam just klass 1 integrone, mille sisaldus oli Leedust isoleeritud kõige madalam.

Antimikroobse resistentsuse seire üle-euroopalise võrgustiku 2013. aasta andmetel esines Euroopa riikides antibiootikumresistentsuse levikul põhja-lõuna ja ida-lääne suunaline gradient, mille järgi antibiootikumresistentsus peaks olema suurem lõunapoolsetes riikides võrreldes põhjapoolsetega ja idapoolsetes riikides võrreldes läänepoolsetega (ECDC, 2014).

Põhja-lõuna suunalise gradiendi näitena leiti, et invasiivse *E. coli* resistentsus kolmanda põlvkonna tsefalosporiinidele oli madalam Rootsis ja Norras võrreldes Itaalia ja Hispaaniaga (vastavalt 5,2% ja 5,5% vs 26,2% ja 13,3%) (ECDC, 2014). Sarnaselt oli *K. pneumoniae* invasiivsete tüvede resistentsus kolmanda põlvkonna tsefalosporiinidele kolmes Skandinaavia riigis madalam kui Baltimaades (2,2–4,0% vs 23,3–66,3%) (ECDC, 2014). Käesolevas töös uuriti geograafilise asukoha poolest küllaltki lähestikku paiknevaid riike, mistõttu selgepiirilist erinevust integronide esinemises ESBL positiivsetes tüvedes ei leitud ning nende andmete põhiselt resistentsusgradiendi teooriale toetuda ei saa. Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa bakterite poolt koloniseeritud peremeesorganismide keskmised vanused olid suhteliselt erinevad, mis võis mõnevõrra riikide vahelist integronide esinemissageduse võrreldavust mõjutada. Näiteks Venemaa patsientide keskmine vanus oli võrreldes teiste riikidega kõige madalam ja suurima varieeruvusega.

Integronide klassid Läänemere riikidest isoleeritud ESBL positiivsetes enterobakterites.

Kliinilistest materjalidest isoleeritud *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes esines kõige rohkem klass 1 integrone kas eraldi või kombinatsioonis teiste klassidega. Läänemere regiooni riikide vahel olid erinevused kolme integronide klassi esinemissageduses. Leedust isoleeritud ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* tüvedes oli vähem klass 1 ja rohkem klass 2 integrone võrreldes teiste riikidega. Venemaalt isoleeritud *E. coli* tüvedes oli enam klass 2 integrone kui Baltimaades. Lätist isoleeritud *K. pneumoniae* tüvedes oli oluliselt vähem klass 3 integrone ja Eestist isoleeritud *E. coli* tüvedes rohkem klass 3 integrone võrreldes teiste riikidega.

Klass 1 integronide kõrge esinemissagedus kliinilistest materjalidest isoleeritud enterobakterites oli sarnane varasemate uuringute tulemustega (Rao et al., 2006; Idrees et al., 2011; Domingues et al., 2012; Chen, 2013; Gillings, 2014). Kõrget klass 1 integronide esinemist võib põhjendada sellega, et mitmete ESBL genotüüpidega bakteritel on suurem šans klass 1 integroni esinemiseks (Cambray et al., 2010; Chen et al., 2013; Gillings, 2014). Samuti on uuringute põhjal selgunud, et klass 1 integroni integraasi geen on aktiivsem ja suudab ekspresseerida rohkem resistentsusgeene kui teised integronide klassid (Gillings, 2014).

Sarnaselt antud uuringuga oli teiste uuringute kohaselt kliinilistes materjalides klass 2 integronide esinemissagedus väga madal (Mobarak-Qamsari et al., 2013; Gillings, 2014; Memariani et al., 2014). Samasugune tulemus on saadud ESBL produtseerivate bakterite korral (Ashayeri-Panah, 2014). Klass 2 integronide madalat esinemissagedust võib seletada kirjanduspõhise teadmisega, et selle klassi integraasi geen on inaktiivne ja nii on selle järjestuses esinevad geenikassetid konserveerunud (Ramírez et al., 2010; Gillings, 2014; Memariani et al., 2014).

Käesolevas töös oli klass 3 integronide esinemissagedus kas eraldi või kombinatsioonis madalam kui klass 1, kuid kõrgem kui klass 2 integronide esinemissagedus. Suurem osa klass 3 integrone esines kombinatsioonis klass 1 integronidega, kuid nende esinemissagedus eraldi oli madal. Kirjanduse andmetel oli klass 3 integronide esinemine kliinilistes materjalides väga madal, neid ei esinenud üldse või neid leiti vaid kombinatsioonis teiste klassidega (Idrees et al., 2011; Ashayeri-Panah et al., 2014; Rizi et al., 2015).

Klass 1 ja 3 integronide kombinatsioon oligi antud töös kõige enam esinevaks kombinatsiooniks, mille esinemissageduses olid riikidevahelised erinevused. Näiteks esines klass 1 ja klass 3 klassi kombinatsiooni *K. pneumoniae* korral kõige rohkem Venemaal ja *E. coli* korral Eestis. Ka kirjanduse andmetel oli klass 1 integronide sagedast esinemist bakterites koos klass 3 integronidega põhjendatud nende kahe klassi ühise evolutsiooniga (Gillings, 2014).

Integronide esinemise seosed ESBL positiivsetes tüvedes bakteriliigi, inimese vanuse, riigi ja kliiniliste materjalidega. Logistilise regressiooni kohandamata mudelis leiti ESBL positiivsetes tüvedes integronide esinemisel seosed bakteriliigi, päritoluriigi ja inimese vanusega. Tõenäosus integronide esinemiseks oli suurem *E. coli* tüvedes võrreldes *K. pneumoniae* tüvedega, Lätis võrreldes Eestiga ning integronide esinemissagedus vähenes inimeste vanuse kasvades. Mitmetes teistes uuringutes on leitud analoogiliselt, et vanuse kasvades integronide esinemise tõenäosus väheneb (Motakefi et al., 2008; Sepp et al., 2009; Brolund et al., 2010).

Kõigile teguritele kohandatud logistilise regressiooni mudelis, kus võeti samaaegselt arvesse nii bakteriliiki, päritoluriiki kui peremeesorganismi vanust, oli integronide esinemine fenotüübiliselt ESBL positiivsetes tüvedes oluliselt seotud vaid bakteriliigiga. Võrreldes *K. pneumoniae*'ga oli tõenäosus integronide esinemiseks oluliselt suurem *E. coli* tüvedes. Antud tulemus on kinnituseks, et mitmete oluliste tegurite samaaegne kaasamine andmeanalüüsi, kus arvestatakse tegurite omavaheliste seoste võimalust, annab võrreldes kahe teguri vahelise seose analüüsimisega olulisemalt täpsema tulemuse. Tulemus on kooskõlas rahvusvaheliste teadusuuringutega, kus on analoogiliselt leitud, et *E. coli* sisaldab rohkem integrone kui *K. pneumoniae* (Motakefi et al., 2008; Brolund et al., 2010).

Integronide esinemine ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes. Integronide esinemissagedus Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes kliinilistes *E. coli* tüvedes ei erinenud. Integronide esinemine oli kliinilistes materjalides kõrge: vere tüvedes üle 85% ja urotüvedes isegi üle 98%. Kirjanduse andmetel oli kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvedes integronide esinemine kõrge nii ESBL negatiivsetes (Idrees et al., 2011; Sun et al., 2013; Barraud et al., 2014; Kõljalg et al., 2014) kui ka ESBL positiivsetes entero-

bakterites (46–99% vs 48–73%) (Rao et al., 2006; Idrees et al., 2011; Karimi et al., 2012; Chen et al., 2013; Barraud et al., 2014). Põhjenduseks võib olla see, et bakterites esinevad ka tühjad integronid, mis ei sisalda oma järjestuses resistentsusgeene (Rosser & Young, 1999; Lin et al., 2015). Seetõttu võib põhjendada ESBL negatiivsete tüvede kõrget integronide sisaldust nende valmidusega antibiootikumresistentsuseks.

Erinevates teadusuuringutes on leitud, et integronide esinemissagedus oli kõrge kõikides uuritud tüvedes, olenemata sellest, kas tegu oli ESBL produtseeriva või mitteprodutseeriva tüvega (Machado et al., 2005; Memariani et al., 2014). Resistentsete integronide kõrget esinemissagedust mõlemates tüvedes võib seletada sellega, et integroni struktuuri esinemine bakteris ei põhjusta resistentsust vaid β -laktaamantibiootikumidele, vaid ka teistele antibiootikumi rühmadele (Barraud et al., 2010; Gillings, 2014; Kargar et al., 2014; Ravi et al., 2014;). Selle väite kinnituseks võiks uuritud ESBL negatiivsed tüved edaspidise teadustöö käigus sekveneerida ja välja selgitada, milliste antibiootikumide vastaseid resistentsusgeene integroni järjestused sisaldavad. Seniajani on vähe uuritud või pole teada paljusid mehhanisme, mis resistentsusgeene ühest bakteriliigist teise kannavad. Nii ESBL positiivsetes kui negatiivsetes bakteritüvedes võivad resistentsusgeene kanda ühest bakterist teise ka mobiilsed DNA elemendid nagu plasmiidid ja transposoonid ilma integroni esinemiseta (Ashayeri-Panah et al., 2014). Seetõttu ei pea integronide kõrge esinemissagedus ja ESBL tootmine bakterites omavahel seotud olemagi, mida võib ka antud töö tulemuste põhjal järeldada.

Integronide esinemine soole mikrobiotast ja kliinilistest materjalist isoleeritud *E. coli* tüvedes. Eesti tervete inimeste soole mikrobiotast isoleeritud tüvedes oli vähem integrone kui kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes. Sarnased tulemused on saadud uuringutes, kus on leitud, et inimese normaalses mikrobiotas esinevatest bakteritest sisaldas integrone ligikaudu 10–50% või isegi veel vähem, samas kui kliinilistest materjalidest isoleeritud enterobakteritest ligi 80% (Gillings, 2014). Inimese normaalsesse mikrobiotasse satuvad resistentsed bakterid ümbritsevast keskkonnast ja resistentsusmehhanism võib ülekanduda patogeenselt bakterilt kommensaalsele (Baharoglu et al., 2013; Rolain, 2013). Võrreldes integronide esinemist keskkonnast, tervete inimeste ja loomade mikrobiotast isoleeritud *E. coli* tüvedes, siis esineb neid kõige rohkem just sel juhul, kui on kasutatud antibiootikumravi (Liu et al., 2013; Gillings, 2014). Alles sealt levivad resistentsed bakterid ümbritsevasse keskkonda.

Töö nõrkused ja tugevused. Töö nõrgaks küljeks võib pidada Läänemere riikide valimite erinevust, kuna koguti kõik järjestikused tüved kindlal ajaperioodil. Riikide vahel olid

erinevused tüvede arvus, kliinilistes materjalides ja patsientide vanuses. Näiteks võis riigiti uuritud patsientide erinev vanus avaldada mõju töö tulemustele, seda eriti tunnuste paariviisilises võrdluses, mida vanusele ei kohandatud. Samuti võisid mõned olulised seosed jääda leidmata väikese valimi tõttu (Läti, Leedu).

Käesoleva töö tugevuseks oli aktuaalse ja uudse teema käsitlemine ning rahvusvahelise võrdluse võimalus. Seniajani puudusid võrdlevad uuringud ja kokkuvõtlikud tulemused Läänemere riikide integronide esinemissagedusest ja nende seostest ESBL produktsiooniga bakterites.

Kokkuvõttes võib käesoleva töö tulemuste põhjal öelda, et vaatamata mõnedele Läänemere riikide vahelistele erinevustele oli ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* kliinilistes tüvedes integronide esinemissagedus kõrge kõigis neljas riigis, kusjuures *E. coli* tüved sisaldasid oluliselt rohkem integrone kui *K. pneumoniae* tüved. Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes kliinilistes *E. coli* tüvedes oli integronide sisaldus mõlemates sarnaselt kõrge. Samas inimese normaalses mikroobiootas oli integronide sisaldus ligi neli korda madalam kui ESBL positiivsetes ja negatiivsetes kliinilistes tüvedes Eestis. Integronide kõrge levimus näitab, et Läänemere riikide kliinilistes tüvedes on valmidus antibiootikum-resistentsuseks. Kindlasti tuleks integronide uurimist jätkata, et välja selgitada, millistele antibiootikumirühmadele integronides sisalduvad resistentsusegeenid kõige sagedamini resistentsust põhjustavad.

7. KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida integronide esinemist Läänemere riikide (Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa) inimestelt isoleeritud *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes. Töö alaesmärgid olid (1) kirjeldada ja võrrelda ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes integronide ja integronide klasside esinemist sõltuvalt riigist ja kliinilisest materjalist, (2) analüüsida ESBL positiivsetes bakteritüvedes integronide esinemise seoseid bakteriliigi, inimese vanuse, päritolu riigi ja kliiniliste materjalidega, (3) kirjeldada integronide esinemist Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes ja (4) võrrelda integronide esinemist Eesti tervete inimeste soole mikrobiotast ja kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvedes.

Uuringumaterjal ja meetodika

- (1) Fenotüübiliselt ESBL positiivsed *K. pneumoniae* (n=531) ja *E. coli* (n=422) tüved, mis koguti Eestist, Lätist, Leedust ja Venemaalt 5 kuu jooksul.
- (2) Fenotüübiliselt ESBL negatiivsed *E. coli* tüved (n=352), mis koguti inimeste kliinilistest materjalidest ja normaalsest soole mikrobiotast Eestis.

Bakteriaalne DNA eraldati kommertsiaalse kitiga ja integraasi geenide detekteerimine teostati multipleks RT PCR-ga. Andmeanalüüsis kasutati statistilisi teste (χ^2 , z, Fisher exact, Mann-Whitney U-test) rühmade vaheliste erinevuste määramiseks ning logistilist regressioonanalüüsi seoste uurimiseks integronide ja erinevate tegurite vahel.

Tulemused

- (1) Läänemere riikides kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL positiivsetes tüvedes oli integronide esinemissagedus kõrge (86–99%). Integronide klassides ja klassikombinatsioonides esinesid riikidevahelised erinevused. Võrreldes teiste riikidega oli Leedust isoleeritud *K. pneumoniae* tüvedes vähem klass 1 ja enam klass 2 integrone, Lätist isoleeritud tüvedes vähem klass 3 integrone ning Venemaal rohkem klass 1 ja 3 kombinatsiooni. Venemaalt isoleeritud *E. coli* tüvedes oli rohkem klass 2 integrone ning Eestist isoleeritud tüvedes enam klass 3 integrone ning klass 1 ja 3 kombinatsiooni.
- (2) Kohandamata logistilise regressiooni mudelis leiti integronide esinemisel seos bakteriliigi (*E. coli* tüvedes rohkem), patsientide vanuse (integronide esinemissagedus vähenes vanuse kasvades) ja päritolu riigiga (Lätis rohkem kui Eestis). Kõigile teguritele kohandatud mudelis jäi oluliseks vaid seos bakteriliigiga (*E. coli* tüvedes rohkem).

- (3) Integronide esinemissagedus nii Eestist isoleeritud ESBL positiivsetes kui ka negatiivsetes *E. coli* kliinilistes tüvedes oli sarnaselt kõrge.
- (4) Eesti tervete inimeste mikrobiotast isoleeritud tüvedes oli integrone oluliselt vähem kui kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL positiivsetes ja negatiivsetes *E. coli* tüvedes.

Käesoleva töö tulemuste põhjal võib öelda, et integronide esinemissagedus ESBL positiivsetes *K. pneumoniae* ja *E. coli* tüvedes kõigis neljas riigis oli kõrge, olles kõrgem *E. coli* tüvedes. Sarnaselt kõrge oli integronide esinemissagedus ESBL negatiivsetes *E. coli* tüvedes, kuid oluliselt madalam terve inimese mikrobiotas Eestis. Kõrge integronide sisaldus näitab, et kõikides kliinilistes tüvedes on valmidus antibiootikumresistentsuseks. Kindlasti tuleks integronide uurimist jätkata, et välja selgitada, millistele antibiootikumirühmadele resistentsed geenid integronides kõige sagedamini esinevad.

8. SUMMARY

Integrans in *Enterobacteriaceae* isolated from human biological materials in Baltic Sea countries

The main aim of this study was to investigate the prevalence of integrans in *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates from different human biological materials in the Baltic Sea countries (Estonia, Latvia, Lithuania and Russia). The objectives were (1) to describe and compare the prevalence of integrans and integron classes in ESBL positive *K. pneumoniae* and *E. coli* strains by country of origin and clinical materials (blood, urine, respiratory tract and pus), (2) to analyse associations between prevalence of integrans and bacterial strains, age of the host species, country of origin and clinical material in ESBL positive bacterial strains, (3) to describe the prevalence of integrans in ESBL positive and negative *E. coli* strains isolated from clinical materials in Estonia, (4) to compare the prevalence of integrans in healthy human microbiota (faeces) with *E. coli* clinical isolates.

Study material and methods:

- (1) Phenotypically ESBL positive *K. pneumoniae* (n=531) and *E. coli* (n=422) strains were collected from clinical materials in four Baltic Sea countries during a five month period.
- (2) Phenotypically ESBL negative *E. coli* strains (n=352) were collected from clinical materials and healthy human microbiota in Estonia.

Total bacterial DNA was extracted by using commercial kit and detection of integrase gene was performed with multiplex real-time PCR. Statistical tests (χ^2 , z, Fisher's exact, Mann-Whitney U-test) were used to assess differences between groups. Logistic regression analysis was used to explore associations between prevalence of integrans and different factors.

Results:

- (1) Integrans in ESBL positive *K. pneumoniae* and *E. coli* clinical isolates were highly prevailed in all Baltic Sea countries (more than 85%). Compared to *K. pneumoniae* the prevalence of integrans was higher in *E. coli*, but it was significantly higher only in Estonia. Compared to the other countries, for *K. pneumoniae* the prevalence of class 1 integrans was the lowest and the prevalence of class 2 integrans the highest in Lithuania, the prevalence of class 3 was the lowest in Latvia. For *E. coli* the prevalence of class 2 integrans was the highest in Russia and the prevalence of class 3 integrans the highest in Estonia. In all four countries combination of class 1 and 3

integrons was the most highly presented. For *K. pneumoniae* the highest prevalence of Int1/Int3 combination was found in Russia and for *E. coli* in Estonia.

- (2) The crude odds ratios showed that the prevalence of integrons in *K. pneumoniae* and *E. coli* clinical isolates was associated with bacterial species (the prevalence was higher in *E. coli*), the age of host species (the prevalence was lower in older people) and by country of origin (the prevalence was higher in Latvia than in Estonia). The fully adjusted odds ratios showed that only bacterial species were associated with the prevalence of integrons in bacteria (the prevalence was higher in *E. coli*).
- (3) The prevalence of integrons was very high in both, ESBL positive and negative *E. coli* clinical isolates.
- (4) The prevalence of integrons was significantly lower in microbiota of healthy human compared to ESBL positive and negative *E. coli* clinical strains.

In conclusion, this study found that the prevalence of integrons was high in ESBL positive *K. pneumoniae* and *E. coli* clinical strains in all 4 countries, being higher in *E. coli* strains. The prevalence of integrons was high as well in ESBL negative *E. coli* strains, but much lower in faeces of healthy human in Estonia. Homogenously high prevalence of integrons in clinical materials shows that integrons are also related to resistance against other antibiotic classes besides β -lactam antibiotics. Further in-depth knowledge of prevalence of integrons is needed to understand better which resistance genes integrons most commonly contain.

9. TÄNUAVALDUSED

Minu südamlik tänu:

- Töö juhendajale Epp Sepale suure pühendumuse ja huvitavate arutelude eest;
- Töö juhendajale Siiri Kõljalale heade nõuannete ja kriitiliste kommentaaride eest;
- Töö kaasjuhendajale Eve Vedlerile toetuse ja asjalike märkuste eest;
- Jelena Štšepetovale ja Tiiu Rööbile õpetuste ja abi eest laboritöös;
- Kristiine Paile ja Kristi Huigile erialaste kogemuste jagamise eest;
- Mikrobioloogia instituudi kollektiivile sõbraliku töökeskkonna loomise eest;
- Inge Ringmetsale väärtuslike statistikaalaste nõuannete eest;
- Karin De Giorgile inglise keele korrektuuri eest;
- Perekonnale ja sõpradele toetava suhtumise eest;

Töö valmis projektide „Antibiootikumresistentsuse molekulaarne multipleks diagnostika“ (SARMB11183T) ja „Antibiootikumiresistentsuse levikuteed“ (8-2/T12036VLBS) raames.

10. KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdelhaleem, A.A., Homeda, H.E., Hershan, A.A., Makeen, A.M. & Alsanosy, R.M. Class 1 integrons gene in drug resistant *E. coli* and isolated from different clinical specimens in Jazan area K.S.A. *International Journal of Current Research*, 6, 9283–9286.
- Ashayeri-Panah, M., Feizabadi, M.M. & Eftekhari, F. (2014). Correlation of multi-drug resistance, integron and blaESBL gene carriage with genetic fingerprints of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7, 1–5.
- Baharoglu, Z., Garriss, G. & Mazel. (2013). Multiple pathways of genome plasticity leading to development of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 2, 288–315.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F. & Ploy, M.C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1642–1645.
- Barraud, O., François, B., Chainier, D., Vignaud, J. & Ploy, M.-C. (2014). Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 351–353.
- Barraud & Ploy. (2015). Diversity of class 1 integron gene cassette rearrangements selected under antibiotic pressure. *Journal of Bacteriology*, doi: 10.1128/JB.02455-14.
- Beta lactam ring action. (2015).
<https://ibchemistrymedicinesanddrugs.wikispaces.com/D.8.3+Drug+Action>
- Blomberg, B. (2008). Antimicrobial resistance in developing countries. *Journal of the Norwegian Medical Association*. 128: 2462–2466.
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G. & Grape, M. (2010). Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS ONE*, 5, 1–5.
- Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39, 1211–1233.
- Bush, K. & Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 969–976.
- Bush, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 31, 43–56.
- Cambray, G., Guerout, A. M. & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44, 141–166.
- Chen, T., Feng, Y., Yuan, J.L., Qi, Y., Cao, Y.X. & Wu, Y. (2013). Class 1 integrons contributes to antibiotic resistance among clinical isolates of *Escherichia coli* producing

- extended-spectrum beta-lactamases. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 31, 385–389.
- Cornelissen, C.N., Fisher, B.D. & Harvey, R.A. (2013). *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. Third edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74, 417–433.
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., & Johnsen, P.J. (2012). Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogenes*, 8: e1002837.
- Domingues, S., da Silva, G.J. & Nielsen, K.M. (2015). Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiology*, doi: 10.1099/mic.0.000099.
- Drouin, F., Mélançon, J. & Roy, P. (2015). The *IntI*-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* in active as an integron integrase. *Journal of Bacteriology*, 184, 1811–1815.
- Earnshaw, S., Monnet, D.L., Duncan, B., O'Toole, J., Ekdahl, K. & Goossens, H. (2009). European Antibiotic Awareness Day, 2008 – the first Europe-wide public information campaign on prudent antibiotic use: methods and survey of activities in participating countries. *Euro surveillance*, 14, 19280.
- Eskola, J., Huovinen, P. & Valtonen, V. (I, II, III osa), Maimets, M. (IV osa). (2000). *Infektsioonhaigused*. AS Medicina; Tallinn. (Tõlge soome keelest: Eskola, J., Huovinen, P., & Valtonen, V. (1998). *Infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus OY Duodecim).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M. & Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 269–284.
- Fluit, A.C., & Schmitz, F.J. (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18, 761–770.
- Fluit, A.C. & Schmitz, F.J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 272–288.
- Frank, U. & Tacconelli, E. (2012). *In-hospital antibiotic therapy*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- Gillings, M.R. (2014). Integrons: past, present, and future. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 78, 257–77.

- Giske, C.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Canton, R. & Walsh, T.R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: Balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 1–4.
- Gombac, F., Riccio, M.L., Rossolini, M.G., Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Lavenia, A. & Dolzani, L. (2002). Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian Hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 3665–3668.
- Gransden, W.R., Eykyn, S.J., Phillips, I. & Rowe, B. (1990). Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, 1008–1018.
- Grape, M., Farra, A., Kronvall, G. & Sundström, L. (2005). Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 185–192.
- Hazen, T.H., Zhao, L., Sahl, J.W., Robinson, G., Harris, A.D., Rasko, D.A. & Johnson, J.K. (2014). Characterization of *Klebsiella* sp. strain 10982, a colonizer of humans that contains novel antibiotic resistance alleles and exhibits genetic similarities to plant and clinical *Klebsiella* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 1879–1888.
- Heir, E., Lindstedt, B.-A., Leegaard, T.M., Gjernes, E. & Kapperud, G. (2004). Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3, 12.
- Idrees, M., Mussart, U., Badshah, Y., Qadir, M. & Bokhari, H. (2011). Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 462–466.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beeta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161–182.
- Kargar, M., Mohammadalipour, Z. & Doosti, A. (2014). High prevalence of class 1 to 3 integrons among multidrug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5, 193–198.
- Karimi, A., Malekan, M., Rahbar, M., Navidinia, M., Fallah, F. & Akhoundtabar, L. (2012). Detection of integron elements and gene groups encoding ESBLs and their prevalence in *E.coli* and *Klebsiella* isolated from urine samples by PCR method. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, e423.
- Kocsis, B. & Szabó, D. (2013). Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Editor A. Méndez-Vilas. Spain, Zurbaran, Formatex Research Centre.
- Kumar, A., Soumynanda, C., Prachi, J., Pinak, C. & Charkraborty, R. (2011). A multiple antibiotic and serum resistant oligotrophic strain, *Klebsiella pneumoniae* MB45 Having

novel dfrA30, is sensitive to ZnO QDs. *Annales Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 1–11.

- Kõljalg, S., Truusalu, K., Štšepetova, J., Pai, K., Vainumäe, I., Sepp, E. & Mikelsaar, M. (2014). The *Escherichia coli* phylogenetic group B2 with integrons prevails in childhood recurrent urinary tract infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 122, 452–458.
- Leverstein-van Hall, M.A., M Blok, H.E., T Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C. & Verhoef, J. (2003). Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, 251–259.
- Li, L., Wang, M. & Yuan, X. (2014). Characterization of integrons among *Escherichia coli* in a region at high incidence of ESBL-EC, *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30, 177–180.
- Lin, M., Liang, J., Zhang, X., Wu, X., Yan, Q. & Luo, Z. (2015). Genetic diversity of three classes of integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from Jiulong River in southern China. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-015-4480-0.
- Linrong, L. (2011). Beeta-lactam antibiotics. Zhejiang University, School of Medicine. <http://pharmacology.xjtu.edu.cn/ppt/b-lactamAntibiotics.pdf>
- Liu, H., Wang, H., Huang, M., Mei, Y., Gu, B., Wu, R., Huang, Y., Chen, Y., Xu, Y. & Wang, T. (2013). Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *Journal of Thoracic Disease*, 5, 149–155.
- Lopes, F.S.M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R. & Crespo, M.T. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Journal of Food Microbiology*, 103, 191–198.
- Lopes, A.C.S., Veras, D.L., Lima, A.M.S., Melo, R.D.C.A. & Ayala, J. (2010). blaCTX-M-2 and blaCTX-M-28 extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 163–167.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.-C., Rollán, A., Peixe, L. & Coque, T.M. (2005). Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1823–1829.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 4, 608–620.
- Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24 (Suppl 1).

- Memariani, M., Peerayeh, S.N., Mostafavi, S.K.S. & Salehi, T.Z. (2014). Detection of Class 1 and 2 Integrons Among Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 2, 1–6.
- Minarini, L.A., Gales, A.C., Palazzo, I.C. & Darini, A.L. (2007). Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Current Microbiology*, 54, 335–341.
- Mobarak-Qamsari, M., Ashayeri-Panah, M., Eftekhari, F. & Feizabadi, M.M. (2013). Integron mediated multidrug resistance in extended spectrum beta-lactamase producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 849–854.
- Motakefi, A., Sudqvist, M., Kahlmeter, G. & Grape, M. (2008). Differences in the distribution of common trimethoprim resistance dfr-genes in *E. coli* and *K. pneumoniae*. 18th European Congress of Microbiology and Infectious Diseases, Spain, Barcelona.
- Nemergut, D.R., Martin, A.P. & Schmidt, S.K. (2004) Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1160–1168.
- Pathogenic Microbiology. (2000). Mechanism of action of beta-lactam antibiotics. <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/BetaLactamAntibiotics.htm>
- Pavelkovich, A., Balode, A., Edquist, P., Egorova, S., Ivanova, M., Kaftyreva, L., Konovalenko, I., Kõljalg, S., Lillo, J., Lipskaya, L., Miciuleviciene, J., Pai, K., Parv, K., Pärna, K., Rööp, T., Sepp, E., Štšepetova, J. & Naaber, P. (2014). Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in the Baltic countries and St. Petersburg area. *BioMed Research International*, 2014. doi:10.1155/2014/548960.
- Pereira, S.G. & Cardoso, O. (2014). Mobile genetic elements of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hydrotherapy facility and respiratory infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, O203–O206.
- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 589–603.
- Ramírez, M.S., Piñeiro, S., Centrón, D., Kaufman, S., Kovensky, J., Vay, C., Argentinian Integron Study Group, Predari, S. (2010). Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 699–706.
- Rao, A.N., Barlow, M., Clark, L.A., Boring, J.R., Tenover, F.C. & McGowan, J.E. (2006). Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1011–1014.
- Ravi, A., Avershina, E., Ludvigsen, J., L'Abée-Lund, T. & Rudi, K. (2014). Integrons in the intestinal microbiota as reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes. *Pathogens*, 3, 238–248.

- Rizi, K.S., Peerayeh, S.N., Bakhshi, B. & Rahbar, M. (2015). Prevalence of integrons and antimicrobial resistance genes among clinical isolates of *Enterobacter* spp. From Hospitals of Tehran. *International Journal of Enteric Pathogens* 3, 1–6.
- Rolain, J. (2013). Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy* 4, 173.
- Rosser, S.J. & Young, H.-K. (1999). Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 11–18.
- Russo, T.A. & Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1753–1754.
- Schofield, C.B. (2011). The anarchy of antibiotic resistance: mechanisms of bacterial resistance. *MLO: Medical Laboratory Observer*, 43, 10–12, 14–16.
- Sedláková, M.H., Urbánek, K., Vojtová, V., Suchánková, H. & Imwensi, P. (2014). Antibiotic consumption and its influence on the resistance in *Enterobacteriaceae*. *BMC Research Notes*, 16, 454.
- Sepp, E., Štšepetova, 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.
- Seward, R.J. (1999). Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, 5, 308–318.
- Shi, L., Zheng, M., Xiao, Z., Asakura, M., Su, J., Li, L. & Yamasaki, S. (2006). Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiology and immunology*, 50, 463–467.
- Smillie, C.S., Smith, M.B., Friedman, J., Cordero, O.X., David, L.A. & Alm, E.J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480, 241–244.
- Solberg, O.D., Ajiboye, R.M. & Riley, L.W. (2006). Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1347–1351.
- Sompolinsky, D., Nitzan, Y., Tetry, S., Wolk, M., Vulikh, I., Kern, M.B., Sadvang, D., Hershkovits, G. & Katcoff, D.J. (2005). Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 119–122.
- Sun, J., Zheng, F., Wang, F., Wu, K., Wang, Q., Chen, Q., Yu, S. & Rui, Y. (2013). Class 1 integrons in urinary isolates of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia*

- coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern China during the past five years. *Microbial Drug Resistance*, 19, 289–294.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 8, 207–217.
- Thomson, J.M. & Bonomo, R.A. (2005). The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology*, 8, 518–24.
- Türk, S. (2015). *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* β -laktaamiresistentsus XXI sajandi teisel kümnendil. *Eesti Arst*, 94, 147–152.
- UPEC project. (2015). (Uropathogenic *E. coli* project). <http://www.genome.wisc.edu/sequencing/upec.htm>
- Van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. & Mevius, D. (2007) Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 746–750.
- Vernet, V., Philippon, A., Madoulet, C, Vistelle, R, Jaussaud, R., Chippaux, C. (1995). Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 130, 51–57.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M. & Torres, C. (2010). Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 492–496.
- Waites, M. (2000). Microbial genetics. Integrons.
<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/transposons/integrons/integrons.html>
- Yang, C.M., Lin, C.H., Huang, Y.T., Hsu, C.T. & Liou, M.L. (2009). Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62, 177–181.
- Yatsunencko, T., Rey, F.E. & Manary, M.J. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 496, 222–227.
- Yu, Y., Ji, S., Chen, Y., Zhou, W., Wei, Z., Li L. & Ma, Y. (2007). Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China. *Journal of Infections*, 54, 53–57.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katri Pärna

sünnikuupäev: 23.04.1989

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Integronid Läänemere riikide inimestelt isoleeritud enterobakterites“, mille juhendajateks olid Epp Sepp, Siiri Kõljalg ja kaasjuhendajaks oli Eve Vedler.

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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2015