

VILNIAUS UNIVERSITETAS

JUSTAS POVILONIS

**PERNEŠAMI ATSPARUMO ANTIBIOTIKAMS GENETINIAI
ELEMENTAI PATOGENINĖSE GRAM NEIGIAMOSE
BAKTERIJOSE**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2008–2012 m. Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje.

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Edita Sužiedėlienė

(Vilniaus universitetas; fiziniai mokslai, biochemija – 04P)

Turinys

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	5
IVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 Bakterijų atsparumo antibiotikams problema.....	12
1.2 Gram neigiamų bakterijų atsparumas antibiotikams.....	13
1.2.1 Hospitalinių infekcijų sukėlėjai ir jų atsparumas antibiotikams.....	14
1.2.1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> – vyraujantis HI sukėlėjas.....	15
1.3 Bakterijų atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai.....	17
1.3.1 Atsparumo antibiotikams genų pernašą lemiantys judrieji genetiniai elementai.....	22
1.3.2 Atsparumo antibiotikams genus pernešančios plazmidės.....	24
1.3.2.1 Enterobakterijų atsparumo plazmidės.....	26
1.3.2.2 <i>A. baumannii</i> plazmidės ir atsparumą antibiotikams lemiantys genetiniai elementai.....	30
1.3.2.3 Atsparumą karbapenemams lemiančių genų pernaša plazmidėmis.....	32
1.3.3 Integronai – dauginio atsparumo antibiotikams nešikliai.....	35
1.3.3.1 Integronų genetinė struktūra.....	36
1.3.3.2 Atsparumo integronai ir super-integronai.....	37
1.3.3.3 Integrazės.....	40
1.3.3.4 Genų kasečių įterpimas į integroną.....	41
1.3.3.5 Genų kasečių ir integrazės geno raiška.....	45
1.3.3.6 Integronų genų kasečių epidemiologija.....	47
1.3.3.7 Integronų kilmė ir evoliucija.....	51
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	54
2.1 Medžiagos.....	54
2.1.1 Reagentai ir bakterijų padermės.....	54
2.1.2 Oligonukleotidiniai pradmenys.....	57
2.2 Tyrimų metodai.....	60
2.2.1 Mėginių paruošimas PGR.....	60
2.2.2 PGR reakcijų sąlygos.....	61
2.2.3 DNR fragmentų frakcionavimas agarozės gelyje.....	62
2.2.4 PGR produktų deproteinizacija, išsodinimas, valymas ir sekoskaita.....	62
2.2.5 Chromosominės DNR išskyrimas.....	63
2.2.6 Plazmidinės DNR išskyrimas.....	64
2.2.7 Pulsuojančio elektrinio lauko gelio elektroforezė (PFGE).....	65
2.2.7.1 Mėginių paruošimas.....	65
2.2.7.2 Elektroforezė.....	66
2.2.8 DNR hibridizacinė analizė.....	66
2.2.8.1 DNR žymėjimas radioaktyviuoju [α - ³² P]-dATP arba biotin-11-dUTP.....	66
2.2.8.2 Gelio ir membranos paruošimas.....	67
2.2.8.3 DNR pernešimas.....	67
2.2.8.4 Hibridizacija.....	67
2.2.9 Imliųjų ląstelių paruošimas ir temperatūrinė transformacija.....	69
2.2.10 Elektro-imliųjų ląstelių paruošimas ir elektroporacija.....	69
2.2.11 Bakterijų konjugacija.....	70
2.2.12 Restrikcinė analizė.....	70
2.2.13 <i>A. baumannii</i> ST tipų nustatymas.....	71

2.2.14 Minimalios slopinančios koncentracijos nustatymas	71
2.2.15 Duomenų vaizdinimas ir bioinformatinė tyrimų rezultatų analizė	71
3. REZULTATAI	73
3.1 Integronų paplitimas ir genetinė struktūra antibiotikams atspariose Gram neigiamose bakterijose.....	73
3.1.1 I ir II klasės integronai <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ir <i>Acinetobacter baumannii</i>	73
3.1.2 I ir II klasės integronų genų kasetės, lemiančios atsparumą antibiotikams	76
3.1.3 I ir II klasės integronų genų kasečių deriniai ir jų paplitimas	80
3.1.3.1 I klasės integronas <i>dfrA17-aadA5Δ-IS26-ΔintI1-aadB-aadA1-cmlA</i> ir jo genetinė aplinka	84
3.1.3.2 I klasės integrono kasetės <i>bla_{OXA-205}</i> , koduojančios naują β-laktamazę, nukleotidų sekos analizė	86
3.1.4. I ir II klasės integronų lokalizacija ir pernaša.....	89
3.1.5 Plazmidžių Inc replikonų grupės klinikinės ir gyvūninės kilmės enterobakterijose.....	90
3.2. Antibiotikams atsparių <i>Acinetobacter baumannii</i> plazmidžių molekulinės epidemiologijos tyrimas.....	91
3.2.1 Lietuvos ligoninėse paplitusių <i>Acinetobacter baumannii</i> genetinis tipavimas ir vyraujančių klonų nustatymas	91
3.2.1.1 <i>A. baumannii</i> PFGE- <i>ApaI</i> pulsotipai ir EC klonai.....	92
3.2.1.2 Vyraujantiems genotipams priklausančių <i>A. baumannii</i> padermių atsparumas antibiotikams.....	93
3.2.2 <i>A. baumannii</i> plazmidžių homologinių replikonų grupės.....	95
3.2.3 <i>A. baumannii</i> GR2 homologinių replikonų grupei priklausančių plazmidžių struktūros tyrimas	99
3.2.4 <i>A. baumannii</i> GR2 plazmidės pAB120 struktūra	101
3.2.4.1 pAB120 plazmidės pernaša ir jos suteikiamo atsparumo antibiotikams tyrimas	101
3.2.4.2 pAB120 plazmidės genetinė struktūra.....	102
3.2.4.3 pAB120 plazmidės Southern tyrimas	107
4. Rezultatų aptarimas	109
Išvados	125
Publikacijos disertacijos tema.....	126
Padėka.....	128
Literatūros šaltiniai	129

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

3'-KS	integrono 3'-konservatyvioji sritis
5'-KS	integrono 5'-konservatyvioji sritis
a. v.	aktyvumo vienetai
AB-PBRT	<i>Acinetobacter baumannii</i> plazmidžių replikonų tipavimas (angl. <i>Acinetobacter baumannii PCR-based replicon typing</i>)
bp	bazių pora
CHDL	karbapenemus hidrolizuojančios D klasės β -laktamazės (angl. <i>carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase</i>)
CI/SI	chromosominiai arba super-integronai
CLSI	Klinikinių ir laboratorinių standartų institutas (angl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DAA	dauginis atsparumas antibiotikams
EARS-Net	Europos atsparumo antibiotikams stebėsenos programa (angl. <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>)
ECI-III	Europinis klonas I–III (angl. <i>European clone I–III</i>)
ESBL	išplėsto spektro β -laktamazės (angl. <i>extended-spectrum β-lactamase</i>)
HGT	horizontali genų pernaša (angl. <i>horizontal gene transfer</i>)
HI	hospitalinės infekcijos
Inc	plazmidžių nesuderinamumo grupė (angl. <i>Incompatibility</i>)
LSMU KK	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikos
LSMU MK	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mikrobiologijos katedra
LSMU VI	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos institutas
MBL	metalo- β -laktamazės
MGE	judrieji genomo elementai (angl. <i>mobile genetic elements</i>)
MI/RI	mobilūs arba atsparumo integronai (angl. <i>mobile integrons/resistance integrons</i>)

MLST	bakterijų tipavimas pagal kelis genomo lokusus (angl. <i>multi-locus sequence typing</i>)
MSK	minimali slopinančioji koncentracija
NDS	natrio dodecilsulfatas
nt	nukleotidas
PBP	peniciliną surišantis baltymas (angl. <i>penicillin-binding protein</i>)
PBRT	plazmidžių replikonų tipavimas (angl. <i>PCR-based replicon typing</i>)
PFGE	pulsuojančio lauko gelio elektroforezė (angl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PGR	polimerazinė grandininė reakcija
RBS	ribosomų prisijungimo sritis (angl. <i>ribosome binding site</i>)
RFLP	restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RŠL	Respublikinė Šiaulių ligoninė
RVUL	Respublikinė Vilniaus universitetinė ligoninė
ST	sekos tipas
TA	toksino-antitoksino sistema
VS	variabilioji sritis

IVADAS

Keletą dešimtmečių trunkantis antibiotikų vartojimas klinikoje, žemės ūkyje, kitose žmogaus ūkinės veiklos srityse lėmė procesus, dėl kurių klinikinėje ir kitoje aplinkoje išsivystė ir paplito bakterijos, pasižyminčios atsparumu antimikrobiniam preparatams. Gram neigiamos bakterijos – ženkli klinikinės reikšmės infekcijų sukėlėjų grupė, kurioje pastaraisiais metais stebima sparti atsparumo naujausiems antibiotikams mechanizmų evoliucija ir atsparių padermių plitimas (Livermore, 2012).

Šiai infekcijų sukėlėjų grupei priklauso plačiai paplitusios enterobakterijos *Escherichia coli* ir *Salmonella enterica*. Daugelis jų rūšių, porūšių, serotipų yra žmogaus ir gyvūnų oportunistiniai patogenai arba tikrieji patogenai. Enterobakterijų sukeltų infekcijų yra registruojama daugybė atvejų net labiausiai išsivysčiusiose pasaulio šalyse (Nordmann ir kt., 2012; Sánchez-Vargas ir kt., 2011). Intensyvus antibiotikų naudojimas veterinarijoje infekcijų prevencijos tikslais taip pat lėmė atsparių *E. coli* ir *S. enterica* padermių dalies augimą (Landers ir kt., 2012). Atsparios antibiotikams enterobakterijų rūšys – zoonotiniai mikroorganizmai – per maisto grandinę gali būti pernešami į žmonių organizmą ir sukelti sunkiai gydomas infekcijas.

Pseudomonas aeruginosa ir *Acinetobacter baumannii* yra oportunistiniai patogenai, kuriems dažnai būdingas dauginio atsparumo antibiotikams (DAA) fenotipas (Livermore, 2009; Peleg ir kt., 2008). *P. aeruginosa* sukeltų sunkiai gydomų infekcijų terapijos metu bakterijos patiria keletą poveikio antibiotikais kursų, ir tokiu būdu gali išvystyti atsparumą beveik visų klasių antibiotikams (Livermore, 2009).

Pastarąjį dešimtmetį labai išaugo *A. baumannii* bakterijų klinikinė reikšmė. Būdamos nereiklios augimo sąlygoms, bakterijos išplito viso pasaulio ligoninėse ir tapo vienu dažniausiu hospitalinių (ligoninėse įgytų) infekcijų sukėlėju (Peleg ir kt., 2008). *A. baumannii* lengvai išvysto atsparumo antibiotikams molekulinis mechanizmus praktiškai visiems žinomiems

antibiotikams. Šis reiškinys siejamas tiek su reguliuojama atsparumo genų raiška, kuri natūraliai būdinga *A. baumannii*, tiek su įgyjamais naujais atsparumo antibiotikams genetiniais elementais (Perez ir kt., 2007).

Bakterijų, pasižyminčių dauginiu atsparumu, nustatoma vis daugiau – mikroorganizmai tampa atsparūs keliems skirtingiems antibiotikams (Rossolini ir Mantengoli, 2008). Per pastarąjį dešimtmetį visame pasaulyje išplito Gram neigiamų bakterijų rūšys, atsparios naujausiems ir plačiausio aktyvumo spektro β -laktaminiams antibiotikams – karbapenemams (Nordmann ir kt., 2012; Pfeifer ir kt., 2010; Kempf ir Rolain, 2012). Atsparumą karbapenemams lemia įvairūs molekuliniai mechanizmai (Walsh, 2008), o vis didėjanti atsparių šiems antibiotikams DAA fenotipu pasižyminčių bakterijų dalis dažnai nepalieka kitų gydymo alternatyvų.

Nustatyta, kad viena pagrindinių priežasčių, kuri lemia spartų atsparių antibiotikams Gram neigiamų bakterijų padermių dalies didėjimą, yra šioms bakterijoms būdinga horizontali genų pernaša (angl. *horizontal gene transfer*, HGT), vykstanti konjugacijos, transformacijos ar transdukcijos būdais (Stokes ir Gillings, 2011). Tokiu būdu atsparumą antibiotikams lemiantys genai plinta tiek rūšies viduje, tiek tarp skirtingų bakterijų genčių.

Plazmidės yra bene svarbiausias veiksnys, darantis įtaką HGT. Plazmidžių gebėjimas pernešti genus, lemiančius atsparumą antibiotikams, pastebėtas gana seniai (Holloway, 1969). Daugiausia žinoma apie *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijoms būdingas „atsparumo“ plazmidės (angl. *resistance plasmids*, R). Nustatyta daugiau nei 1000 enterobakterijų R plazmidžių. Šiuo metu didžiausias dėmesys sutelktas į kliniškai svarbių Gram neigiamų bakterijų rūšių plazmidžių tipų ir su jais siejamų atsparumo įvairiems antibiotikams genų ryšio nustatymui (Carattoli, 2009; 2011). Susisteminti atsparumo plazmidžių epidemiologijos duomenys leidžia sekti atsparumo genų pernašos kelius ir galimus tokių plazmidžių šeiminkus.

Su HGT fenomenu ir dauginio atsparumo antibiotikams fenotipu glaudžiai susiję savitieji Gram neigiamų bakterijų genetiniai elementai – integronai (Fluit ir Schmitz, 2004). Tai yra genetinės struktūros, koduojančios

genus, užtikrinančius sričiai savitą DNR rekombinaciją, kurios metu įterpiami genai, lemiantys atsparumą įvairiems antibiotikams. Įterptos genų kasetės pasižymi labai didele kombinacijų įvairove (Partridge ir kt., 2009). Prieš įterpiant, jos egzistuoja nedidelėse žiedinėse DNR ir yra neaktyvios. Integrono koduojamai integrazei įterpus jas už integrone esančio promotoriaus, vyksta įterptų genų raiška. Integronų judrumą, o tuo pačiu ir atsparumo plitimą, dažniausiai užtikrina transpozonai ir plazmidės (Boucher ir kt., 2007).

Siekiant išaiškinti atsparumo antibiotikams atsiradimo priežastis, plitimą, evoliuciją, pernašos kryptis, svarbūs tampa tyrimai molekulinio lygiu, kuriais nustatomi atsparumą lemiantys genetiniai elementai, atsparumo molekuliniai mechanizmai ir plitimo tarp bakterijų molekuliniai būdai.

Šio **darbo tikslas** buvo nustatyti, koks yra su atsparumu antibiotikams susijusių pernešamų genetinių elementų paplitimas, struktūra ir įvairovė Lietuvoje išskirtose antibiotikams atspariose patogeninėse Gram neigiamose bakterijose.

Tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

- Ištirti integronų paplitimą antibiotikams atspariose *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* bakterijose, išskirtose iš žmonių ir gyvūnų;
- Nustatyti integronų struktūrą, juose esančius atsparumo antibiotikams genetinius elementus ir jų įvairovę;
- Ištirti plazmidžių paplitimą ir įvairovę antibiotikams atspariose *Enterobacteriaceae* šeimos ir *A. baumannii* bakterijose;
- Nustatyti naujos *A. baumannii* plazmidės pAB120, pernešančios atsparumą karbapenemams suteikiančius genus, struktūrą.

Mokslinis naujumas

Pateikiamas darbas yra pirmasis, Lietuvoje išskirtų atsparių antibiotikams Gram neigiamų patogeninių bakterijų, išsamus molekulinės epidemiologijos tyrimas. Darbe apibūdinome atsparumo antibiotikams pernašos genetinius elementus iš 859 Gram neigiamų bakterijų padermių, išskirtų iš sergančių žmonių, sveikų ir sergančių gyvūnų.

Darbe nustatėme tris naujus integronus ir ištyrėme jų struktūrą. *P. aeruginosa* integrone nustatėme naują D klasės β -laktamazę OXA-205, kuri papildo OXA tipo β -laktamazių, paplitusių antibiotikams atspariose bakterijose, įvairovę.

Itin išsamiai molekuliniais būdais apibūdinome hospitalinių infekcijų sukėlėjo *A. baumannii* populiaciją, cirkuliuojančią Lietuvos ligoninėse, ypač didelį dėmesį skirdami plazmidžių ir su jomis susijusių genų, lemiančių atsparumą karbapenemams, tyrimams. Pirmą kartą parodėme, kokie epideminiai *A. baumannii* klonai, besiskiriantys atsparumo antibiotikams profiliais ir atsparumą lemiančiais genetiniais elementais, vyrauja šalies ligoninėse. Nustatėme ir apibūdinome naują *A. baumannii* plazmidę, turinčią atsparumo karbapenemams genus ir pasižyminčią rekombinacijos potencialu; parodėme, kad plazmidę turinčios *A. baumannii* padermės išplito mūsų šalies ligoninėse per pastaruosius kelerius metus ir taip lėmė atsparumo karbapenemams šuolį. Šiame darbe nustatyti ir apibūdinti genetiniai elementai gali būti naudojami kaip taikiniai greitam *A. baumannii* klonų nustatymui molekuliniais metodais ir kaip molekuliniai žymenys infekcijų kontrolei.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- Integronų paplitimo dažnis ir atsparumo genų įvairovė rodo DAA fenotipo išplitimo mastą Lietuvoje išskirtose klinikinės ir gyvūninės kilmės Gram neigiamose bakterijose ir liudija apie atsaką gydymui vartojamiems aminoglikozidų, sulfonamidų/trimetoprino, β -laktamų, makrolidų klasių antibiotikams;
- Integronuose esančios atsparumą antibiotikams lemiančios genetinės determinantės per zoonotinius mikroorganizmus gali būti pernešamos iš gyvūnų į žmogaus organizmą;
- Lietuvos ligoninėse paplitusios *A. baumannii* pandeminių klonų linijos ECI ir ECII, kurioms būdingi skirtingi plazmidžių replikonų tipai ir jų deriniai. Integronus turinčiose *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose vyrauja IncF tipo plazmidės;
- Šalies ligoninėse cirkuliuojančių *A. baumannii* atsparumą karbapenemams daugiausia lėmė nauja plazmidė pAB120, turinti karbapenemazės OXA-72 genus;
- Plazmidė pAB120 pasižymi Xer rekombinacijos potencialu, kuri gali būti svarbi *A. baumannii* įgyjant *bla*_{OXA-24/40}-šeima karbapenemazių genus ir vykstant plazmidžių pertvarkai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bakterijų atsparumo antibiotikams problema

XX a. pirmoje pusėje A. Flemingo atrastas penicilinas buvo bene didžiausias šiuolaikinės medicinos atradimas, nuo kurio pasaulyje prasidėjo antibakterinių preparatų era, iš esmės pakeitusi visą infekcinių bakterinės kilmės ligų gydymo sampratą. Per daugiau nei 70 metų gamtoje atrasta ar cheminiu būdu susintetinta daugybė plataus spektro ir skirtingo veikimo antibiotikų, veiksmingų prieš daugumą mikroorganizmų. Tai gerokai palengvino bakterinės kilmės infekcijų gydymą, reikšmingai sumažino pacientų mirtingumą ir tuo pačiu pailgino vidutinę žmonių gyvenimo trukmę. Neilgai trukus antibiotikai, kaip terapinė ir profilaktinė priemonė, buvo sėkmingai pradėti naudoti veterinarijoje ir kitose ūkio srityse.

Vis dėlto per pastaruosius 15 – 20 metų situacija pasaulyje labai pasikeitė. Gausus antibiotikų vartojimas lėmė atsparumo jiems atsiradimą ir atsparumą lemiančių genetinių determinančių paplitimą tarp daugelio bakterijų rūšių. Nors pats A. Flemingas įžvalgiai numatė galimybę, kad bakterijos per evoliuciją gali prisitaikyti ir išvystyti atsparumą antibiotikams, manyta, kad mutacijų dažnis, dėl kurių atsiranda atsparios bakterijos, yra pernelyg nereikšmingas (Davies, 1994). Vis dėlto akivaizdu, kad buvo nepakankamai įvertintas bakterijų gebėjimas išvystyti pačius įvairiausius atsparumo mechanizmus, pasitelkiant didelį bakterijų genomo plastiškumą ir tokiu būdu prisitaikant prie sparčiai besikeičiančių aplinkos sąlygų. Ypač netikėta buvo tai, kad bakterijos gali keistis atsparumą lemiančiais veiksniais tarpusavyje, kas šiuo metu yra apibrėžiama kaip horizontali genų pernaša (van Hoek ir kt., 2011). Neabejojama, kad pastaroji bakterijų savybė labai paspartino atsparumo išplitimą įvairiose ekologinėse nišose. Svarbu tai, kad palaipsniui vystėsi atsparumas ne tik pavieniams antibiotikams, bet ir dauginis atsparumas. Pirmosios DAA padermės buvo išskirtos dar praėjusio amžiaus penktajame dešimtmetyje, tačiau tik gerokai vėliau suprasta, kad DAA fenotipą gali lemti

tam tikri genetiniai elementai, esantys pernešamose plazmidėse (Mitsuhashi ir kt., 1961; Liebert ir kt., 1999).

1.2 Gram neigiamų bakterijų atsparumas antibiotikams

Jeigu pastaraisiais metais Gram teigiamų bakterijų epidemiologijoje stebimas atsparių bakterijų dalies mažėjimas, tai Gram neigiamų bakterijų atveju atsparumo problema kasmet gilėja (Livermore, 2012; van Duijn ir kt., 2011). Tarptautinių stebėsenos tinklų duomenimis, daugelyje šalių sparčiai plinta antibiotikams atsparios Gram neigiamos bakterijos, tokios kaip *E. coli* ir *K. pneumoniae*, sukeliančios hospitalines t.y., ligoninėse įgytas (HI) ir visuomenėje įgytas infekcijas, kurių gydymui dėl bakterijų dauginio atsparumo antibiotikams dažnai nėra alternatyvų (Souli ir kt., 2008; van Duijn ir kt., 2011). Antibiotikams atsparių Gram neigiamų bakterijų dalies didėjimas siejamas su jose esančių atsparumo genų lokalizacija – atsparumą lemiančios determinantės gali nesunkiai plisti rūšies viduje ar tarp skirtingų genčių, nes Gram neigiamose bakterijose tokie genai yra judriuosiuose genomo elementuose – integronuose, transpozonuose, pernešamose plazmidėse (van Duijn ir kt., 2011; Woodford ir kt., 2011). Sparčiai plinta chinolonams ir cefalosporinams atsparios *Enterobacteriaceae* rūšys, OXA šeimos karbapenemazes gaminančios *A. baumannii*, metalo-β-laktamazes gaminančios *Enterobacteriaceae* ir *P. aeruginosa* (Livermore, 2012). Tarp infekcijas sukeliančių Gram neigiamų bakterijų, gaminančių išplėsto spektro β-laktamazes (ESBL), *E. coli* nustatoma daugiausia. Pvz., kraujotakos infekcijas sukeliančių ESBL gaminančių *E. coli* dalis kai kuriose šalyse siekia beveik 20 % (van Duijn ir kt., 2011). Kai kurių patogeninių *E. coli* genotipai (pvz., ST131) išplitę daugelyje pasaulio šalių, o pandeminiu mastu paplitusios ESBL CTX-M-15 genai, taip pat atsparumą chinolonams lemiantys genai labai dažnai sutinkami *E. coli* ST131 plazmidėse (Woodford ir kt., 2011). Plazmidėse esančių *bla*_{OXA-24/40}-šeima, *bla*_{OXA-23}-šeima, *bla*_{OXA-58}-šeima genų koduojamos karbapenemazės neabejotinai prisideda prie karbapenemams atsparių

Acinetobacter spp. dalies augimo (Poirel ir Nordmann, 2006; Higgins ir kt., 2010).

2011 m. EARS-Net ataskaitoje skelbiama, kad visoje Europoje išplitusių atsparių *E. coli* padermių dalis nuolat didėja. Atsparumas aminopenicilinams kai kuriose šalyse siekia net 83 % (Lietuvoje 2006–2010 m. 50–58 %), atsparumas trečios kartos cefalosporinams per paskutinius ketverius metus reikšmingai išaugo daugiau nei pusėje tyrime dalyvaujančių šalių (Lietuvoje – nuo 5 % iki 9 %) (EARS, 2011). Pusėje duomenis teikiančių šalių DAA *K. pneumoniae* (atsparių trečios kartos cefalosporinams, fluorochinolonams ir aminoglikozidams) dalis viršijo 10 %. Daugelyje šalių, ypač Pietų ir Rytų Europoje, išlieka aukštas *P. aeruginosa* atsparumo lygis fluorochinolonams ir karbapenemams (Lietuvoje 2006 – 2010 m. atitinkamai 16 – 46 % ir 19 – 30 %). Bendrai yra stebimas antimikrobinio atsparumo didėjimas Europoje šiaurės – pietų kryptimi, t.y., kai kurioms patogenų ir antibiotikų kombinacijoms didesnė atsparių padermių dalis yra nustatoma Pietų Europos šalyse, mažesnė – Šiaurės Europoje (pvz., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) (EARS, 2011).

Ypatingą susirūpinimą kelia antibiotikams atsparių bakterijų plitimas maisto grandine. Akivaizdu, kad antibiotikams atsparesnės zoonotinės bakterijos kelia pavojų visuomenės sveikatai, visų pirma dėl dažnesnių nesėkmingų gydymo rezultatų. Pavojų kelia ir komensalinės (indikatorinės) bakterijos, tokios kaip *E. coli*, kurios gali dalyvauti atsparumą koduojančių genų pernašoje tarp gyvūnų, žmonių ir aplinkos (Angulo ir kt., 2004).

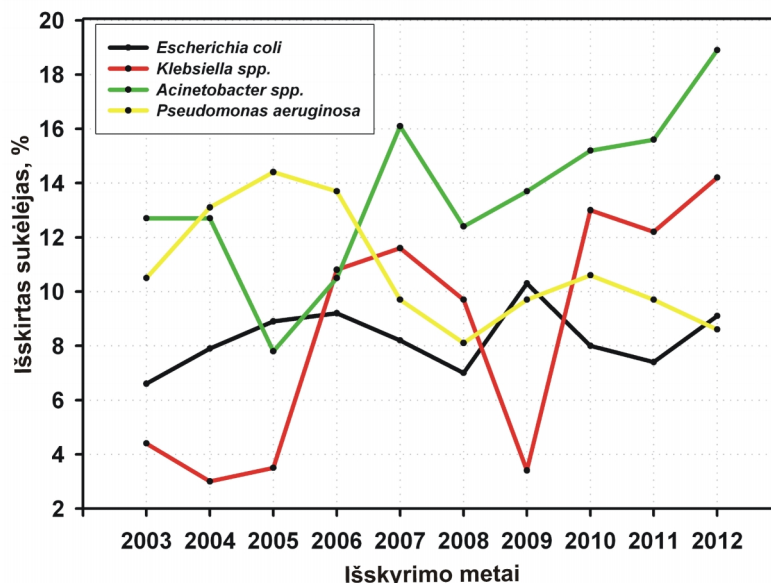
1.2.1 Hospitalinių infekcijų sukėlėjai ir jų atsparumas antibiotikams

Didelė šiandienos problema medicinoje yra hospitalinės infekcijos, kai užsikrečiama sąlygiškai patogeninėmis bakterijomis (oportunistiniais patogenais), cirkuliuojančiomis pačioje gydymo įstaigoje. Tokios bakterijos išgyvena esant intensyviai antibiotikų fonui ir yra įgijusios jiems atsparumą, taip pat ir dauginį. Tokių bakterijų sukeltos infekcijos yra sunkiai gydomos arba netgi visai neišgydomos (Giamarellou, 2010). Pastaraisiais metais didelį

susirūpinimą kelia itin spartus HI sukeliančių atsparių antibiotikams bakterijų padermių plitimas visame pasaulyje.

1.2.1.1 *Acinetobacter baumannii* – vyraujantis HI sukėlėjas

Tarp kliniškai svarbiausių Gram neigiamų bakterijų - HI sukėlėjų, reikšmingą vietą užima nefermentuojančios *Acinetobacter* genties bakterijos, ypač *Acinetobacter baumannii* rūšis (Higgins ir kt., 2010; Gordon ir Wareham, 2010), nors dar prieš keletą dešimtmečių *Acinetobacter* spp. laikytos sąlygiškai nepatogeniškomis. Labai rimta *Acinetobacter baumannii* sukeltų HI epidemiologinė situacija susiklostė ir Lietuvos ligoninėse. Higienos instituto duomenimis, 2003 – 2012 m. Lietuvos bendrojo pobūdžio ligoninėse HI buvo diagnozuota 3,4–4,6 % gydytų ligonių. Daugiausia HI registruota reanimacijos-intensyvios terapijos skyriuose (10–22 %), kur jų dažnis 2 – 3 kartus viršijo HI dažnį kituose skyriuose (chirurgijos, terapijos) (http://www.hi.lt/content/hsp_duom_atask.html). *Acinetobacter* genties bakterijos minėtoju laikotarpiu buvo dažniausias hospitalinių infekcijų sukėlėjas Lietuvos ligoninių intensyviosios terapijos skyriuose (1.1 pav.).



1.1 pav. Su Gram neigiamomis bakterijomis susijusios HI infekcijos Lietuvos ligoninių intensyvios terapijos skyriuose 2003 – 2012 m. (http://www.hi.lt/content/hsp_duom_atask.html)

Žinomos mažiausiai 32 rūšys, priklausančios *Acinetobacter* genčiai. Kliniškai svarbiausios – *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* (anksčiau – *genomic species 13TU*) ir *Acinetobacter pittii* (anksčiau – *genomic species 3*) (Dijkshoorn ir kt., 2007; Nemeč ir kt., 2011). HI dažniausiai sukelia *A. baumannii* rūšis. Dažniausios infekcijos yra dirbtinai ventiliuojamų plaučių pneumonija, šlapimo takų, pooperacinių chirurginių žaizdų infekcijos, bakteremija (Sunenshine ir kt., 2007, Peleg ir kt., 2008; Tsakris ir kt., 2008). DAA fenotipu pasižyminčių *A. baumannii* padermių sukeltos infekcijos yra vienos sunkiausiai gydomų (Maragakis ir Perl, 2008). *A. baumannii* bakterijos yra nereiklios – ant sausų paviršių kambario temperatūroje jos gali išgyventi žymiai ilgiau, nei *E. coli*, kartais net iki kelių mėnesių (Wendt ir kt., 1997; Jawad ir kt., 1998; Lee ir kt., 2011). Kitaip nei kitas HI sukėlėjas *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. vienodai gerai išgyvena sausoje ir drėgnoje aplinkoje. Greičiausiai šios savybės ir lėmė, kad *Acinetobacter* spp. puikiai įsitvirtino ligoninėse (Getchell-White ir kt., 1989; Lee ir kt., 2011). Tačiau ypatingo dėmesio *Acinetobacter* spp. sulaukė dėl beveik neriboto gebėjimo įgyti atsparumą antibiotikams (Zarrilli ir kt., 2009).

Dėl įvairių genetinių vyksmų klinikinės *Acinetobacter* spp. padermės tapo atsparios plataus veikimo spektro β -laktamams, aminoglikozidams, fluorochinolonams ir tetraciklinams – t.y., įgijo dauginį atsparumą antibiotikams. Atsparumo potencialą gerai iliustruoja 86 kb DNR sritis („sala“), nustatyta atsparios *A. baumannii* padermės genome. Ši „sala“ turėjo 45 genus, lemiančius atsparumą įvairių klasių antibiotikams (Souli ir kt., 2008). Taip pat verta pažymėti, kad visame pasaulyje greitai plinta atsparumas karbapenemų klasės antibiotikams. Kai kurių šalių ligoninėse atsparių karbapenemams *Acinetobacter* spp. dalis jau siekia 20 – 30 % (Higgins ir kt., 2010; Kempf ir Rolain, 2012). Karbapenemai (imipenemas, meropenemas, ertapenemas, doripenemas ir kt.) – β -laktamų klasės antibiotikai, klinikoje naudojami nuo 1985 m. ir pasižymintys labai plačiu antibakteriniu spektru (Birnbaum ir kt., 1985). Jų cheminė struktūra (1.3 pav.) lemia atsparumą daugeliui bakterijų gaminamų β -laktamazių (Livermore ir Woodford, 2000), todėl karbapenemai

lieka vienais iš nedaugelio vaistų, kurie veiksmingi gydant tokių bakterijų sukeltas infekcijas. Karbapenemams atsparios *A. baumannii* padermės paprastai būna atsparios ir beveik visų kitų klasių antibiotikams, tačiau dažniausiai yra jautrios glicilciklinių klasės antibiotikui tigeciklinui, taip pat kolistinui (Šeputienė ir kt., 2010b; Zarrilli ir kt., 2009; Tripodi ir kt., 2007). Vis dėlto, pastaraisiais metais užfiksuojami atsparių *A. baumannii* atvejai net ir šiems antibiotikams (Navon-Venezia ir kt., 2007; Cai ir kt., 2012). Bakterijoms išvysčius atsparumą karbapenemams, lieka labai mažai galimybių infekcijoms gydyti (Paterson ir Bonomo, 2005).

1.3 Bakterijų atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai

Bakterijų atsparumą įvairių klasių antibiotikams gali lemti keli skirtingi molekuliniai mechanizmai (van Hoek ir kt., 2011; McDermott ir kt., 2003; Wright, 2005):

- Apribotas antibiotikų patekimas į ląstelės vidų, tokiu būdu apsunkinant jų patekimą prie taikinio;
- Aktyvus antibiotikų šalinimas iš ląstelės;
- Fermentinis antibiotikų išveiklinimas (acetilinimas, fosforilinimas ir kt.);
- Antibiotikų suardymas;
- Naujų metabolinių kelių įgijimas pakeičiant senuosius, kuriuos slopina antibiotikų poveikis;
- Antibiotikų taikinių modifikacijos, mutacijos, susilpninančios antibiotiko ir jo taikinio sąveiką;
- Padidėjusi antibiotiko taikinio (baltymo) raiška.

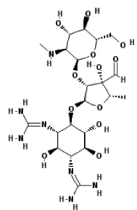
Atsparumas skirtingų klasių antibiotikams dažniausiai pasireiškia kelių skirtingų mechanizmų kombinacijomis, tik retais atvejais atsparumą nulemia kuris vienas mechanizmas. Pavyzdžiui, atsparumą vieniems iš ilgiausiai klinikoje vartojamų antibiotikų – aminoglikozidams (1.2 pav.), kurie slopina baltymų sintezę, dažniausiai lemia fermentinis antibiotikų išveiklinimas. Jį atlieka trijų tipų fermentai – acetiltransferazės,

nukleotidiltransferazės ir fosfotransferazės (Ramirez ir Tolmanky, 2010; Magnet ir Blanchard, 2005; Vakulenko ir Mobashery, 2003). Be to, aminoglikozidai gali būti šalinami iš ląstelės membraniniais siurbliais arba atsparumas šiems antibiotikams išsivysto įvykus ribosomų pokyčiams (Magnet ir kt., 2001; Poehlsgaard ir Douthwaite, 2005). Labai panašiai atsparumas pasireiškia ir kitiems baltymų sintezę slopinantiems antibiotikams – chloramfenikoliui ir tetraciklinams (1.2 pav.). Chloramfenikolį dažniausiai išveiklina įvairių tipų acetiltransferazės, gali vykti atsparumą suteikiančios taikinio mutacijos, arba antibiotikas šalinamas membraniniais siurbliais (Schwarz ir kt., 2004). Yra žinoma virš 40 skirtingų genų, koduojančių baltymus, lemiančius atsparumą tetraciklinui. Didžioji jų dalis – membraniniai siurbliai, kiti – ribosomų apsauginiai baltymai (angl. *ribosomal protection proteins*, RPP), keli – antibiotikus modifikuojantys fermentai (van Hoek ir kt., 2011; Roberts, 2005).

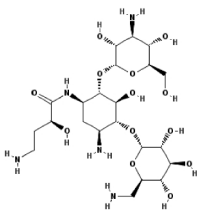
Trimetoprimas ir sulfonamidų klasės antibiotikai (dažniausiai sulfametoksazolas), bakterijose slopinantys folio rūgšties biosintezę, dėl savo sinergistinio baktericidinio poveikio terapijoje dažnai naudojami kartu (taip vadinama ko-trimoksazolo kombinacija) (Sköld, 2001; Roberts, 2002) (1.2 pav.). Jie yra sintetiniai antibiotikai, todėl bakterijos stokoja fermentų, kurie galėtų ardyti ar modifikuodami išveiklinti tokius vaistus (van Hoek ir kt., 2011). Trimetoprimas slopina bakterijų dihidrofolato reduktazę (DHFR), koduojamą chromosomoje, o sulfonamidai – dihidropteorato sintazę (DHPS). Bakterijos tampa atsparios trimetoprimui, joms įgijus nealelinių genų, koduojančių pakeistas DHFR, (van Hoek ir kt., 2011), o sulfonamidams – įgijus *sul* genus, koduojančius pakeistas DHPS (Perreten ir Boerlin, 2003).

Aminoglikozidai

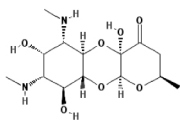
Baltymų biosintezės slopikliai



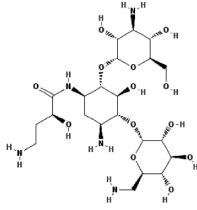
Streptomicinas



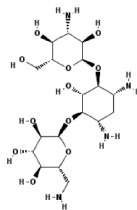
Tobramicinas



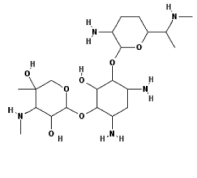
Spektinomicinas



Amikacinas



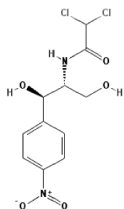
Kanamicinas



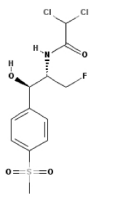
Gentamicinas

Fenikolai

Baltymų biosintezės slopikliai



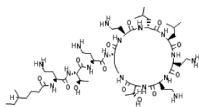
Chloramfenikolas



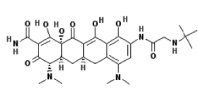
Florfenikolas

Kiti

Membranos laidininkai, baltymų biosintezės slopikliai



Kolistinas



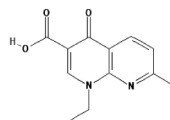
Tigeciklinas

Fluorochinolonai

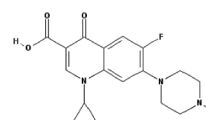
DNR biosintezės slopikliai

1 karta

2 karta



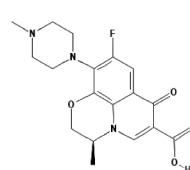
Nalidikso r.



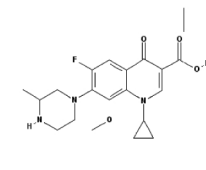
Ciprofloksacinas

3 karta

4 karta



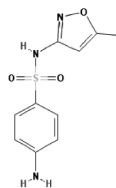
Levofloksacinas



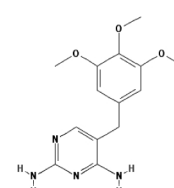
Gatifloksacinas

Sulfonamidai/Trimetoprimas

DNR biosintezės slopikliai



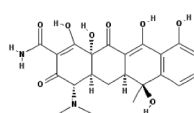
Sulfametoksazolas



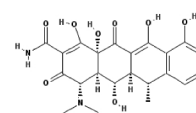
Trimetoprimas

Tetraciklinai

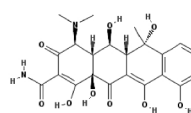
Baltymų biosintezės slopikliai



Tetraciklinas



Doksiciklinas



Oksitetraciklinas

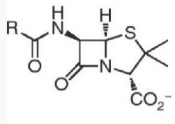
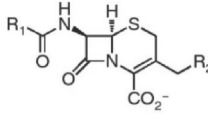
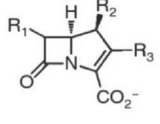
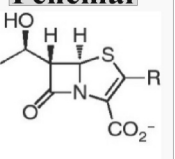
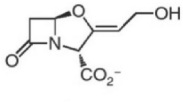
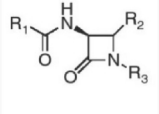
1.2 pav. Antibiotikų, veiksmingų prieš Gram neigiamas bakterijas, pagrindinės klasės. (β -laktaminiai antibiotikai pristatomi paveiksle 1.3).

Chinolonai ir fluorochinolonai (1.2 pav.) – dar viena klasė sintetinių antibiotikų, kurie klinikoje vartojami jau beveik pusę amžiaus. Šie vaistai veikia slopindami DNR replikacijoje dalyvaujančius fermentus – DNR girazę ir topoizomerazę IV (Hooper, 2001). Atsparumas jiems gali išsivystyti keliais skirtingais būdais: netekus porinų, ir taip sumažėjus išorinės membranos laidumui, padidėjus membraninius siurblius koduojančių genų raiškai arba įvykus mutacijoms genuose, koduojančiuose DNR girazę ir topoizomerazę (Ruiz, 2003; Jacoby, 2005). Visi šie pokyčiai vyksta bakterijų chromosomoje. Tačiau neseniai nustatytos plazmidžių determinantės, lemiančios atsparumą fluorochinolonams. Šiuo metu žinomos mažiausiai penkios šeimos *qnr* genų, plazmidėse koduojančių DNR girazės ir topoizomerazės IV apsauginius baltymus, taip pat genai *qep*, koduojantys membraninius siurblius (Strahilevitz ir kt., 2009; Cattoir ir Nordmann, 2009; Périchon ir kt., 2007). Vienas plazmidžių koduojamas atsparumo fluorochinolonams mechanizmas yra labai įdomus – įvykus mutacijoms aminoglikozidų aciltransferazę koduojančiame gene *aac(6′)-Ib*, dėl kurių pasikeičia dvi aminorūgštys, mutantinis fermentas (AAC(6′)-Ib-cr) įgyja gebėjimą acilinti ir chinolonų klasės antibiotiką ciprofloksaciną (Park ir kt., 2006).

Didžiausia ir plačiausiai vartojamų antibiotikų klasė yra β -laktamai, kuriems priskiriami visi antibiotikai, savo molekuliniėje struktūroje turintys β -laktamo žiedą – penicilinais ir modifikuoti jų dariniai, cefalosporinai (I-IV kartos), karbapenemai, monobaktamai, taip pat β -laktamazių slopikliai (Bush ir Jacoby, 2010) (1.3 pav.). β -laktamų veikimo mechanizmas paremtas bakterijų ląstelės sienelės sintezės slopinimu. β -laktaminiai antibiotikai jungiasi prie transpeptidazių, kurios kartu yra ir penicilinus surišantys baltymai (angl. *penicillin-binding proteins*, PBPs) ir slopina peptidoglikano pirmtakų sujungimą (Drawz ir Bonomo, 2010). Pagrindinis bakterijų išvystytas būdas, leidžiantis apsisaugoti nuo šių antibiotikų baktericidinio poveikio – β -laktamazių gamyba, kurios skaldo į bakterijų ląstelę patekusių antibiotikų β -laktamo žiedą ir tokiu būdu juos suardo (Bradford, 2001). Taip pat gali vykti

mutacijos PBP koduojančiuose genuose, taip susilpninant sąveikos tarp PBP ir β -laktamo veiksmingumą (Bradford, 2001).

β -laktaminiai antibiotikai

<p style="text-align: center;">Penicilinai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Siauro spektro: Benzilpenicilinas Kloksacilinas Meticilinas</p> <p>Vidutinio spektro: Ampicilinas Amoksicilinas</p> <p>Išplėsto spektro:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ureidopenicilinai Mezlocilinas Piperacilinas • Karboksipenicilinai Tikarcilinas Karbenicilinas 	<p style="text-align: center;">Cefalosporinai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Vidutinio spektro:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 kartos Cefalotinas Cefazolinas • 2 kartos Cefuroksimas Cefoksitinas <p>Plataus spektro:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 kartos Ceftazidimas Cefotaksimas • 4 kartos Cefepimas Cefpiromas 	<p style="text-align: center;">Karbapenemai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Plataus spektro: Imipenemas Meropenemas Ertapenemas Doripenemas</p> <p style="text-align: center;">Penemai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Faropenemas</p>	<p style="text-align: center;">β-laktamazių slopikliai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Klavulano r. (Naudojamas su amoksicilinu, tikarcilinu) Sulbaktamas (naudojamas su ampicilinu) Tazobaktamas (naudojamas su piperacilinu)</p> <p style="text-align: center;">Monobaktamai</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Aztreonamas</p>
---	--	---	---

1.3 pav. β -laktaminių antibiotikų klasės pagrindiniai atstovai.

Bakterijos dažnai tampa atsparios iš karto kelių klasių antibiotikams ir įgyja dauginio atsparumo antibiotikams fenotipą. Nustatyti du savitieji DAA pasireiškimo būdai – kryžmiškasis (angl. *cross-resistance*) ir vadinamasis koatsparumas (angl. *co-resistance*). Kryžmiškojo atsparumo atveju mikroorganizmai atsparūs ne vienam, o iš karto keliems antibiotikams. Įrodyta, kad čia svarbų vaidmenį vaidina membranų siurbliai, neatrankiai šalinantys svetimas medžiagas iš ląstelės citozolio. Šie siurbliai paplitę tiek tarp Gram neigiamųjų, tiek tarp Gram teigiamųjų bakterijų (Sundsford ir kt., 2004).

Koatsparumo atveju atsparumo determinantės yra genetiškai susijusios, o jų raiška vyksta kartu. Šio mechanizmo pavyzdys yra genetinės struktūros – integronai, pirmiausiai aptikti Gram neigiamose, vėliau – ir Gram teigiamose bakterijose (Rowe-Magnus ir Mazel, 2001).

Bakterijų atsparumo antibiotikams determinantės gali būti pernešamos iš vienu bakterijų į kitas, tokiu būdu atsparumui išplintant įvairiose ekologinėse nišose. Įrodyti keli galimi pernašos būdai – transformacija, transdukcija ir konjugacija (Sundsford ir kt., 2004).

1.3.1 Atsparumo antibiotikams genų pernašą lemiantys judrieji genetiniai elementai

Atsparumo antibiotikams įgijimas bakterijose ir jo išplitimas įvairiose ekologinėse nišose neatsiejamas nuo horizontalios genų pernašos, HGT. Pirmą kartą su šia problema susidurta dar praėjusio amžiaus šeštajame dešimtmetyje Japonijoje, kai paaiškėjo, kad *Shigella* spp. dizenterijos protrūkių metu infekcijų gydymo nesėkmes lėmė atsparumo tuomet taikytiems antibiotikams išplitimas episomomis (Watanabe ir Fukasawa, 1961, Aminov, 2011). Šiuo metu išskiriami trys pagrindiniai HGT mechanizmai – transdukcija, transformacija ir konjugacija. Transdukcijos būdu atsparumo antibiotikams genai gali būti pernešami fago dalele, kuri infekuoja kitas bakterijas, įterpdama donorinės bakterijos DNR fragmentą (Willi ir kt., 1997). Kai kurios bakterijos, pvz., *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* spp., yra labai imlios svetimai DNR, kuri, transformacijos būdu patekusi į ląstelę, homologinės rekombinacijos arba transpozicijos mechanizmais integruojama į genomą, arba gali replikuotis autonomiškai (Kovács ir kt., 2009; Rumbo ir kt., 2011). Horizontaliai pernašai konjugacijos būdu bakterijos taip pat pasitelkia judriuosius genetinius elementus (angl. *mobile genetic elements*, MGE) (van Hoek ir kt., 2011; Wozniak ir Waldor, 2010). Apibendrinant daugelio tyrimų rezultatus ir išvadas, pripažįstama, kad evoliucijos eigoje per milijardus metų aplinkos mikrobiotoje susikaupė didžiulė įvairovė atsparumo antibiotikams genų ir praktiškai nėra jokių ribų šių genų pernašai tarp visose ekologinėse nišose paplitusių mikroorganizmų HGT mechanizmais (Aminov ir Mackie, 2007, Aminov, 2009, Aminov, 2011; Wright, 2010).

MGE galima suskirstyti į dvi dideles grupes – elementus, pernešamus iš vienos bakterijos į kitą (pvz., konjugacinės atsparumo plazmidės ir konjugaciniai atsparumo transpozonai) ir elementus, galinčius keisti savo padėtį toje pačioje ląstelėje (pvz., atsparumo transpozonai, insercinės sekos) (Bennett, 2008).

Pernešamos (konjugacinės) plazmidės laikomos veiksniumi, lėmusiu atsparumo antibiotikams išplitimą tarp bakterijų. Plazmidės – tai ekstra-

chromosominiai bakterijų genomo elementai, gebantys autonomiškai replikuotis ir plačiai paplitę daugumoje prokariotų rūšių. Be replikacijai, virulentiškumui ar adaptacijai svarbių genų, plazmidėse labai dažnai sutinkami atsparumo antibiotikams determinantes koduojantys genai (Carattoli, 2009). Plazmidės, dažnai turėdamos pernašą užtikrinančius genus ir pernašos pradžios vietą, geba konjugacijos būdu pernešti savo genetinę medžiagą į kitas bakterijas (Smillie kt., 2010). Plazmidės, turinčios bent vieną atsparumo antibiotikams geną, laikomos "atsparumo" plazmidėmis ir dažnai yra konjugacinės arba mobilizuojamos (neturinčios konjugacijai reikalingų genų, tačiau jų pernaša į kitas bakterijas vyksta padedant toje pačioje ląstelėje esančiai konjugacinei plazmidei) (Bennett, 2008). Plačiau atsparumo antibiotikams koduojančius genus pernešančios plazmidės Gram neigiamose bakterijose bus aptariamoms 1.3.2 skyriuje.

Transpozonai – savo padėtį bakterijų genome galintys keisti genetiniai elementai, sudaryti iš invertuotomis sekomis apsupto už transpoziciją atsakingo geno (koduoja fermentą transpozazę), insercinės sekos ir su transpozicija nesusijusio geno (dažnai atsparumą antibiotikams koduojantis genas) (Roberts ir kt., 2008). Įprastai transpozonai patys savaime negali būti pernešami į kitas bakterijas, nebent jie yra įsiterpę į kitus elementus, gebančius konjugacijos būdu pernešti savo DNR (pvz., transpozonai, įsiterpę konjugacinėse plazmidėse) (van Hoek ir kt., 2011). Vis dėlto, yra žinomi transpozonai, turintys savo sudėtyje ir konjugacijai būtinų elementų (Roberts ir kt., 2008). Tokie transpozonai konjugacijos būdu pernešami į kitas bakterijas, tačiau kitaip nei konjugacinės plazmidės, negali autonomiškai replikuotis ir turi integruotis į besireplikuojančią genomo dalį (chromosomą ar plazmides). Be to, konjugaciniai transpozonai gali mobilizuoti kitus genetinius elementus, neturinčius už konjugaciją atsakingos dalies, ir tokiu būdu taip pat pernešti atsparumo antibiotikams genus tarp skirtingų bakterijų (Frost ir Koraimann, 2010).

Vienas naujai atrastų mechanizmų, susijusių su atsparumo antibiotikams genų pernaša ir už atsparumą atsakingų genetinių struktūrų

susidarymą, yra vadinamoji ISCR sistema (Bennett, 2008). ISCR elementai glaudžiai susiję su IS91 insercinių sekų šeima. Kitaip nei įprastos insercinės sekos ar transpozonai, šie elementai migruoja vadinamuoju "besisukančio rato" transpozicijos mechanizmu (Tavakoli ir kt., 2000; Toleman ir kt.; 2006a,b). ISCR elementuose greta transpozazę koduojančio geno gali būti įsiterpę genai, lemiantys atsparumą praktiškai visų klasių antibiotikams, todėl manoma, kad jie gali būti labai svarbūs atsparumo genų kaupimui, pernašai ir didesnių struktūrų, atsakingų už atsparumą antibiotikams (pvz., chromosominių atsparumo „salų“, atsparumo plazmidžių) susidarymui (Toleman ir kt., 2006a).

Integronai – atsparumo antibiotikams genų kaupimo ir raiškos genetinė sistema, sričiai savitos rekombinacijos būdu tarp dviejų rekombinacijos vietų įterpianti/šalinanti nedidelius DNR fragmentus – genų kasetes, kuriose paprastai yra atsparumą įvairių klasių antibiotikams lemiantys genai (Fluit ir Schmitz, 1999). Atsparumo genai, esantys kasetėje, yra neaktyvūs, nes neturi promotoriaus. Jų raiška vyksta tik kasetes įterpus į integroną, nuo promotoriaus, esančio konservatyvioje integrono dalyje (Depardieu ir kt., 2007) (pav. 1.4). Integronai patys nėra mobilūs, nes neturi transpozicijos elementus koduojančių genų, tačiau labai dažnai būdami kitų mobilių genetinių elementų sudėtyje (transpozonuose, plazmidėse), gali keisti padėtį ir/arba pernešti atsparumo antibiotikams genus į kitas bakterijas (Stalder ir kt., 2012). Plačiau integronai, jų genetinės struktūros ypatumai, genų kasetės ir jų raiška aprašyta 1.3.3 skyriuje.

1.3.2 Atsparumo antibiotikams genus pernešančios plazmidės

Prie nuolat kintančių aplinkos sąlygų bakterijos prisitaiko įgydamos naujas savybes, o plazmidės yra vienas veiksnys, leidžiančių prokariotams išgyventi nepalankiomis aplinkos sąlygomis (Slater ir kt., 2008). Be genų, atsakingų už autonominę replikaciją ir jos valdymą, kopijų skaičių ir paveldėjimą ląstelės dalijimosi metu, plazmidėse dažnai yra genų, suteikiančių bakterijai-šeimininkei papildomų savybių (Nordström, 2006; Thomas ir Nielsen, 2005). Genai, koduojantys baltymus, lemiančius atsparumą įvairiems

antibiotikams, labai dažnai yra būtent plazmidėse (Carattoli, 2011). Įvairiais tipavimo metodais nustatyta daugiau nei 1000 atsparumo plazmidžių tipų (Carattoli, 2009). Neretai plazmidės be atsparumą antibiotikams koduojančių genų, taip pat turi ir genų, koduojančių įvairius virulentiškumo veiksnius (bakteriocinus, citotoksinus, adhezijos baltymus) (Thomas ir Nielsen, 2005). Visos šios plazmidžių suteikiamos savybės leidžia kai kurioms patogeniškomis bakterijų rūšims sėkmingai įsitvirtinti klinikinėje aplinkoje (Carattoli, 2011).

Lyginant su chromosomomis, plazmidės pasižymi labai dinamiška genetinė organizacija, kai yra prarandami turimi, arba įgyjami nauji genai, kinta jų išsidėstymas. Tokių plazmidžių genetinį plastiškumą apsprendžia plazmidėse esanti transpozicijos veiksnius koduojančių elementų gausa ir įvairovė (Osborn ir Böltner, 2002). Įdomu tai, kad sėkmingam plazmidžių išlaikymui bakterijų populiacijoje ne visuomet būtinas nuolatinis aplinkos veiksnių „spaudimas“, skatinantis plazmidėse esančių genų raišką. Plazmidės neretai turi genų, koduojančių vadinamąsias toksino-antitoksino (TA) sistemas, kurios užtikrina sėkmingą plazmidžių paveldėjimą ir nesant atrankiam aplinkos spaudimui (Hayes, 2003; Carattoli, 2009). Be įprasto „vertikalaus“ paveldėjimo dukterinėms bakterijos-šeimininkės ląstelėms, plazmidės konjugacijos būdu gali būti perduodamos tos pačios arba skirtingų genčių bakterijoms („horizontali“ pernaša) (Smillie ir kt., 2010). Tokiu būdu, ta pati plazmidė gali įsitvirtinti genetiškai skirtinguose mikroorganizmuose ir suteikti jiems naudingas adaptyvias savybes, o atsparumo plazmidžių atveju – suteikti atsparumo įvairiems antibiotikams fenotipą ir sąlygoti atsparumo išplitimą skirtingose ekologinėse nišose (Fondi ir kt., 2010; Carattoli, 2011).

Vienos plazmidės gali replikuotis ir būti sėkmingai perduodamos tarp labai artimų bakterijų rūšių, kitų šeimininkų ratas labai platus (Carattoli, 2009). Tai susiję su tuo, kad plazmidės nors ir yra autonomiškai besireplikuojantys geno elementai, vis dėlto, kai kurių jų replikacijai būtini baltymai, koduojami bakterijos-šeimininkės chromosomoje (Carattoli, 2009). Be to, pastebėta, kad atsparumo plazmidės pasižymi ir savitumu tam tikriems atsparumo genams, t.y., kai kurie plazmidžių tipai perneša genus, koduojančius

atsparumą tik konkretiems antibiotikams (žr. 1.3.2.1 sk.). Todėl pastaraisiais metais suvokta, kad norint suprasti atsparumo genų įgijimo priežastis ir jų plitimo kryptis, būtina tirti tokius genus pernešančių plazmidžių epidemiologiją, ypatingą dėmesį kreipiant į vyraujančius atsparumo plazmidžių šeimininkus, pačių plazmidžių paplitimo mastą, atsparumo genų sąsają su tam tikrais plazmidžių tipais bei visų šių veiksnių tarpusavio ryšį (Carattoli, 2009; 2011). Vyraujančių atsparumo plazmidžių tipų nustatymas galėtų prisidėti kuriant naujas antimikrobinio atsparumo plitimo prevencijos strategijas, pvz., anti-plazmidinių vaistų terapiją (Carattoli, 2009; DeNap ir Hergenrother, 2005).

1.3.2.1 Enterobakterijų atsparumo plazmidės

Enterobacteriaceae šeimos bakterijų atsparumo plazmidžių epidemiologijos tyrimai remiasi plazmidžių nesuderinamumo (angl. *Incompatibility*, Inc) grupių nustatymu tiriamoje bakterijų populiacijoje (Carattoli, 2011). Plazmidžių nesuderinamumas – kelių panašių plazmidžių negebėjimas egzistuoti kartu vienoje bakterijų genetinėje linijoje, atsirandantis dėl vienodų replikacijos mechanizmų (Novick, 1987). Šiuo metu *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose yra žinomos 27 Inc grupės, o populiariausias enterobakterijų plazmidžių tipavimo metodas remiasi pagrindinių Inc grupių plazmidžių skirtingomis replikono (*rep* genų ir *ori* sekų) sritimis (angl. *PCR-based replicon typing*, PBRT) (Carattoli, 2009; Carattoli ir kt., 2005).

Tarp enterobakterijų atsparumo antibiotikams genus pernešančių plazmidžių dažniausios grupės yra IncF, IncA/C, IncL/M ir IncI1 (Carattoli, 2009). IncF grupės plazmidės yra mažakopijinės, paprastai jos turi daugiau nei vieną replikoną. Manoma, kad prie išplėsto spektro β-laktamazės CTX-M-15 pandemio mąsto išplitimo prisidėjo tai, kad ją koduojantis genas *bla*_{CTX-M-15} dažnai sutinkamas šioje heterogeniškoje IncF plazmidžių grupėje (Carattoli, 2009). IncF grupės plazmidėse taip pat yra aptinkami genai *armA*, *rmtB* (atsparumas aminoglikozidams), *qnrB*, *qepA*, *aac(6′)-Ib-cr* (atsparumas

chinolonams) (Carattoli, 2009). Nustatyta, kad IncL/M grupės plazmidėmis Rytų Europos šalyse, ypač Lenkijoje, išplito kita ESBL – CTX-M-3 (Baraniak ir kt., 2002; Marcadé ir kt., 2009). Kartu su *bla*_{CTX-M-3} genais, IncL/M plazmidėse neretai sutinkami ir 16S rRNR metilazes koduojantys ir atsparumą aminoglikozidams lemiantys genai *armA* (Sabtcheva ir kt., 2008; Berçot ir kt., 2008). IncA/C plazmidėms būdingi genai, koduojantys karbapenemazes CMY-2, ESBL VEB-1, atsparumo chinolonams baltymą QnrA1 (Carattoli, 2009). IncI1 grupės plazmidėmis gali plisti β -laktamazės koduojantys *bla*_{TEM-52} ar *bla*_{CTX-M-1} genai (Cloeckaert ir kt., 2007; Girlich ir kt., 2007). Lentelėje 1.1 pateiktos visame pasaulyje paplitusios pagrindinės DAA *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų plazmidžių Inc grupės, šiose plazmidėse esantys atsparumo antibiotikams genai ir plazmidžių galimi šeiminkai.

Lentelė 1.1 *Enterobacteriaceae* genties bakterijose vyraujančios atsparumo plazmidžių Inc grupės ir jų pernešami atsparumo genai (pagal Carattoli, 2009).

Plazmidžių Inc grupė	Plazmidėse esantys genai, lemiantys atsparumą	Antibiotikas	Bakterijos-šeimininkės	
HI	HI1	<i>bla</i> _{TEM-1}	Penicilinai	<i>S. enterica</i>
	HI2	<i>bla</i> _{CMY-8} <i>bla</i> _{CTX-M3}	Karbapenemai, cefalosporinai	<i>K. pneumoniae</i>
		<i>bla</i> _{CTX-M-2} <i>bla</i> _{CTX-M-14}	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
		<i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{IMP-4} <i>qnrB2</i> <i>qnrB4</i> <i>armA</i>	Penicilinai Karbapenemai, chinolonai, aminoglikozidai	<i>C. youngae</i>
		<i>bla</i> _{IMP-8} <i>qnrB2</i> <i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{VIM-1} <i>armA</i>	Karbapenemai, chinolonai, penicilinai Karbapenemai Aminoglikozidai	<i>E. cloacae</i>
		<i>qnrA1</i> <i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{CTX-M-3} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>qnrS1</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Chinolonai, penicilinai, cefalosporinai	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>
II	<i>bla</i> _{CMY-2}	Karbapenemai	<i>S. enterica</i>	
	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	Cefalosporinai	<i>S. enterica</i>	
	<i>bla</i> _{CMY-7}	Karbapenemai	<i>E. coli</i>	

Lentelės 1.1 tęsinys

Plazmidžių Inc grupė	Plazmidėse esantys genai, lemiantys atsparumą	Antibiotikas	Bakterijos-šeimininkės
II	<i>bla</i> CMY-21	Karbapenemai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-1	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-2		
	<i>bla</i> CTX-M-14		
	<i>bla</i> CTX-M-24		
	<i>rmtB bla</i> CTX-M-14	Aminoglikozidai, cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-15 <i>bla</i> TEM-1	Cefalosporinai, penicilinai, chinolonai	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>bla</i> TEM-1 <i>bla</i> TEM-52 <i>bla</i> SHV-12 <i>bla</i> VIM-1	Penicilinai	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	<i>bla</i> CTX-M-9 <i>mphA</i> <i>qnrA1 bla</i> SHV-12	Karbapenemai Cefalosporinai Makrolidai	<i>S. sonnei</i> <i>K. pneumoniae</i>
	<i>bla</i> CTX-M-3 <i>bla</i> CTX-M-9 <i>aac</i> (6')-Ib-cr	Chinolonai, penicilinai, cefalosporinai	<i>K. pneumoniae</i>
L/M	<i>bla</i> CTX-M-1	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-15 <i>bla</i> TEM-1	Cefalosporinai, penicilinai, chinolonai	
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>bla</i> CTX-M-42 <i>bla</i> TEM-3 <i>bla</i> TEM-10 <i>bla</i> CTX-M-3 <i>armA</i>	Cefalosporinai, aminoglikozidai	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. Marcescens</i>
	<i>bla</i> SHV-5	Penicilinai	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i>
	<i>bla</i> IMP-4 <i>qnrB2 qnrB4 armA</i>	Karbapenemai, chinolonai, aminoglikozidai	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. amalonaticus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>M. morgani</i>
	<i>armA</i>	Aminoglikozidai	<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. morgani</i> , <i>S. marcescens</i>
	<i>qnrA1 bla</i> SHV-12 <i>bla</i> CTX-M-3 <i>bla</i> CTX-M-9 <i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>qnrB1 aac</i> (6')-Ib-cr	Chinolonai, penicilinai, cefalosporinai	<i>E. cloacae</i> , <i>S. marcescens</i>
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>bla</i> DHA-1 <i>bla</i> SHV-12 <i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>qnrB19 bla</i> SHV-12 <i>qnrS1 aac</i> (6')-Ib-cr	Chinolonai	<i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> <i>E. cloacae</i> <i>C. freundii</i>
		Cefalosporinai, penicilinai, chinolonai	<i>S. enterica</i> <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
		Chinolonai	<i>K. pneumoniae</i>
N	<i>bla</i> CTX-M-1 <i>bla</i> VIM-1 <i>bla</i> CTX-M-3 <i>armA</i>	Cefalosporinai Karbapenemai Cefalosporinai, aminoglikozidai	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>
	<i>bla</i> KPC-2 <i>qnrA3</i>	Karbapenemai Chinolonai	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ascorbata</i>

Lentelės 1.1 tęsinys

Plazmidžių Inc grupė	Plazmidėse esantys genai, lemiantys atsparumą	Antibiotikas	Bakterijos-šeimininkės	
N	<i>qnrB2 blaCTX-M-3 aac(6')-Ib-cr qnrB19 blaSHV-12 qnrS1 aac(6')-Ib-cr blaCTX-M-15 blaTEM-1 aac(6')-Ib-cr blaCTX-M-32 blaCTX-M-40 armA</i>	Chinolonai, cefalosporinai Chinolonai, penicilinai Chinolonai Cefalosporinai, penicilinai, chinolonai Cefalosporinai Aminoglikozidai	<i>S. enterica</i> <i>E. coli</i>	
	FIA-FIB	<i>blaCMY-2</i>	Karbapenemai <i>E. coli</i>	
F	<i>blaCTX-M-3 armA</i>	Cefalosporinai, aminoglikozidai Cefalosporinai	<i>E. coli</i>	
	<i>blaCTX-M-24 blaCTX-M-27 blaCTX-M-1 blaSHV-12 rmtB blaCTX-M-14</i>	Penicilinai Aminoglikozidai, cefalosporinai	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli, K. pneumoniae</i>	
	<i>qnrA1 blaSHV-12 blaCTX-M-3 blaCTX-M-9 aac(6')-Ib-cr</i>	Chinolonai, penicilinai, cefalosporinai	<i>E. aerogenes</i>	
	FVII	<i>blaCTX-M-2</i>	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	FII, FIB	<i>blaCTX-M-9 blaSHV-2 blaCTX-M-14 blaSHV-5 blaSHV-12</i>	Cefalosporinai Penicilinai Cefalosporinai Penicilinai	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli, K. pneumoniae</i> <i>E. coli, K. pneumoniae</i> <i>E. aerogenes, S. marcescens</i>
		<i>blaCTX-M-15 blaTEM-1 aac(6')-Ib-cr blaTEM-1 qepA qnrS1 rmtB</i>	Cefalosporinai, penicilinai, chinolonai Penicilinai Chinolonai, aminoglikozidai	<i>E. coli, K. pneumoniae, S. sonnei, S. enterica</i> <i>E. coli</i> <i>E. aerogenes, E. coli</i>
		<i>blaDHA-1 qepA-2 qnrB2 blaCTX-M-3 aac(6')-Ib-cr</i>	Cefalosporinai Chinolonai Chinolonai, cefalosporinai	<i>S. enterica</i> <i>E. coli</i>
	FII, FIIIA	<i>armA</i>	Aminoglikozidai	<i>E. coli, K. pneumoniae, E. cloacae, S. marcescens</i>
	FIIIA, FIA	<i>qnrB2 blaCTX-M-3 aac(6')-Ib-cr qnrB4 armA blaCTX-M-14 blaDHA-1 blaSHV-12 aac(6')-Ib-cr</i>	Chinolonai, cefalosporinai Chinolonai, aminoglikozidai, cefalosporinai, penicilinai	<i>E. coli</i> <i>E. coli, K. pneumoniae, E. cloacae</i>
	FIIIA	<i>qnrB6 armA blaDHA-1</i>	Chinolonai, aminoglikozidai, cefalosporinai	<i>K. pneumoniae,</i>
W	<i>blaVIM-1</i>	Karbapenemai	<i>S. liquefaciens, K. oxytoca</i>	
Y	<i>blaCTX-M-9</i>	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>	
P	<i>blaCTX-M-2</i>	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>	
	<i>blaCTX-M-9 blaIMP-13</i>	Karbapenemai	<i>E. coli, K. pneumoniae</i> <i>S. enterica</i>	

Lentelės 1.1 tęsinys

Plazmidžių Inc grupė	Plazmidėse esantys genai, lemiantys atsparumą	Antibiotikas	Bakterijos-šeimininkės
A/C	<i>bla</i> CMY-4	Karbapenemai	<i>S. enterica</i>
	<i>bla</i> CMY-2		<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>
	<i>bla</i> CTX-M-2	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-3 <i>armA</i>	Cefalosporinai, aminoglikozidai	
	<i>bla</i> CTX-M-14	Cefalosporinai	
	<i>bla</i> CTX-M-15	Cefalosporinai,	
	<i>bla</i> TEM-1 <i>aac</i> (6')-Ib- <i>cr</i>	penicilinai, chinolonai	
	<i>bla</i> CTX-M-56	Cefalosporinai	
	<i>bla</i> SHV-2	Penicilinai	
	<i>bla</i> SHV-5		
<i>bla</i> SHV-12			
<i>bla</i> TEM-3			
<i>bla</i> TEM-21			
<i>bla</i> TEM-24			
<i>bla</i> VEB-1 <i>qnrA1</i>	Cefalosporinai, chinolonai	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. Freundii</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. mirabilis</i>	
<i>bla</i> IMP-4 <i>qnrB2</i> <i>qnrB-4</i> <i>armA</i>	Karbapenemai, chinolonai, aminoglikozidai	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i>	
<i>bla</i> VIM-4 <i>bla</i> CMY-4 <i>armA</i> <i>rmtB</i> <i>bla</i> CTX-M-14	Karbapenemai Aminoglikozidai Aminoglikozidai, cefalosporinai	<i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i>	
K	<i>bla</i> CTX-M-9	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
	<i>bla</i> CTX-M-10		
	<i>bla</i> CTX-M-14		
	<i>bla</i> TEM-1	Penicilinai	
B/O	<i>bla</i> CTX-M-9	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
B	<i>bla</i> CTX-M-14	Cefalosporinai	<i>E. coli</i>
Q	<i>bla</i> CTX-M-53	Cefalosporinai	<i>S. enterica</i>
	<i>bla</i> GES-5		<i>E. cloacae</i>
	<i>qnrS2</i>	Chinolonai	ND
ColE	<i>bla</i> CMY-31	Karbapenemai	<i>S. enterica</i>
	<i>qnrB19</i> <i>bla</i> SHV-12	Chinolonai, penicilinai	
	<i>bla</i> CMY-36	Karbapenemai	<i>K. pneumoniae</i>
	<i>bla</i> CTX-M-17	Cefalosporinai	
	<i>bla</i> KPC-2	Karbapenemai	
R	<i>bla</i> TEM-1	Penicilinai	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
	<i>qnrS1</i> <i>aac</i> (6')-Ib- <i>cr</i>	Chinolonai	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
U	<i>qnrS2</i>	Chinolonai	<i>A. punctata</i> , <i>A. allosaccharophila</i> , <i>A. media</i>

1.3.2.2 A. baumannii plazmidės ir atsparumą antibiotikams lemiantys genetiniai elementai

Apie *Acinetobacter* spp. plazmidės iki šiol žinoma labai mažai. Pirmieji *Acinetobacter* genties plazmidžių tyrimai atlikti dar 1985 m., kai buvo nustatyta, kad enterobakterijų pagrindinėms Inc grupėms priklausančios

plazmidės gali būti pernešamos iš *E. coli* į *Acinetobacter* spp., tačiau tolesnis jų išlaikymas ir pernaša labai priklauso nuo *Acinetobacter* genčiai natūraliai būdingų plazmidžių (Chopade ir kt., 1985). Nors vėliau buvo pasiūlyti *Acinetobacter* spp. plazmidžių tipavimo metodai (Seifert ir kt., 1994), tačiau iki pastarųjų metų nebuvo publikuota jokių reikšmingų duomenų, susijusių su *Acinetobacter* spp. plazmidžių epidemiologija. Tokių tyrimų būtinybę liudija ir hipotezės, kad vis labiau pasaulyje plintantis *A. baumannii* atsparumas karbapenemams gali būti iš dalies nulemtas plazmidėmis plintančių D klasės β -laktamazių, hidrolizuojančių karbapenemus (angl. *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase*, CHDL) (Poirel ir kt., 2010b).

2010 m. paskelbtas bioinformatinis tyrimas, kuriame *in silico* analizuota žinomų 29 *Acinetobacter* spp. (aplinkos ir kliniškai svarbių rūšių) plazmidžių DNR (Fondi ir kt., 2010). Šioje publikacijoje akcentuota transpozicijos elementų ir sunkiųjų metalų (gyvsidabrio) atrankaus spaudimo reikšmė *Acinetobacter* spp. plazmidžių genetinei evoliucijai. Pastebėta, kad nors daugumoje plazmidžių nebuvo nustatyta už jų pernašą ar mobilizavimą atsakingų elementų, tačiau, panašu, tai nesudaro kliūčių HGT, o taip pat ir plazmidžių genetinės struktūros pertvarkai. Be to, pažymėta, kad visas tirtas plazmidės galima suskirstyti į tris grupes (aplinkai būdingų *Acinetobacter* rūšių pKLH plazmidžių šeima; *A. baumannii* plazmidžių šeima; įvairių kitų *Acinetobacter* rūšių plazmidės), kuriose nustatomi bendri genetiniai žymenys liudija egzistuojant evoliucinius ryšius, nepaisant skirtingos plazmidžių šeimininkų prigimties (Fondi ir kt., 2010).

Reikšmingą postūmį *A. baumannii* plazmidžių epidemiologiniams tyrimams ateityje turėtų suteikti bioinformatinis A. Bertini ir bendraautorų tyrimas (2010). *in silico* buvo nustatytos žinomų plazmidžių replikonų sričių nukleotidų sekos ir atlikta jų palyginamoji analizė (Bertini ir kt., 2010). Remiantis nustatyta replikazes koduojančių genų homologija, buvo pasiūlytas *A. baumannii* plazmidžių tipavimo būdas (AB-PBRT). Visi žinomų *A. baumannii* plazmidžių replikonai buvo suskirstyti į 19 homologinių grupių (GR1-19). Taip pat atkreiptas dėmesys, kad *A. baumannii* replikonai

reikšmingai skiriasi nuo visų kitų plazmidžių replikonų, žinomų prokariotuose. Tai reiškia, kad *A. baumannii* bakterijose cirkuliuoja tik šiai rūšiai būdingos plazmidės (Bertini ir kt., 2010).

2011 m. AB-PBRT metodas buvo sėkmingai panaudotas K. Towner ir kt. atliktame tyrime, kuriame analizuotos DAA klinikinės kilmės *A. baumannii* iš 17 Europos šalių (Towner ir kt., 2011). Paaiškėjo, kad tirtoje bakterijų populiacijoje labiausiai paplitusios GR6 (*repAci6* replikonas) ir GR2 (*repAci1/repAci2* replikonai) homologinėms replikonų grupėms priklausančios plazmidės. Analizuoti ryšiai tarp homologinių replikonų grupių ir padermėse nustatytų CHDL koduojančių genų: OXA-58 šeimos karbapenemazes produkuojančiose padermėse nustatytos GR2, GR3, GR4 arba GR10 replikonų grupės, OXA-23 ir OXA-24/40 šeimų karbapenemazes – GR2 grupė (Towner ir kt., 2011). Įdomu, kad tik GR6 grupei priskiriamos plazmidės turi *tra* genus, koduojančius konjugacinei pernašai reikalingus baltymus, o šių plazmidžių pernaša parodyta eksperimentiškai (Bertini ir kt., 2010; Towner ir kt., 2011). Be to, pastebėta, kad dalis *A. baumannii* plazmidžių turi genų, koduojančių Mob šeimos baltymus, būdingus mažoms plazmidėms, kurios yra mobilizuojamos didesnių konjugacinių plazmidžių (Bertini ir kt., 2010). Spėjama, kad vienas iš veiksmų, turinčių įtakos *A. baumannii* plazmidžių ir jose esamų atsparumo genų horizontaliai pernašai, yra šiai rūšiai natūraliai būdingos *repAci6* tipo plazmidės (Towner ir kt., 2011).

1.3.2.3 Atsparumą karbapenemams lemiančių genų pernaša plazmidėmis

Atsparumas karbapenemams pasireiškia skirtingais molekuliniais mechanizmais, tačiau labiausiai paplitęs ir geriausiai žinomas yra bakterijų gaminamos karbapenemus hidrolizuojančios β -laktamazės (karbapenemazės). Enterobakterijų atsparumą karbapenemams daugiausia lemia *bla*_{KPC} genų koduojamos karbapenemazės KPC (dar vadinamos *K. pneumoniae* karbapenemazėmis) ir *bla*_{IMP} bei *bla*_{VIM} genų koduojamos metalo- β -laktamazės (MBL) (Gupta ir kt., 2011). KPC β -laktamazės vyrauja *K. pneumoniae* bakterijų klinikinėse padermėse, tačiau žinoma, kad šie fermentai gali lemti

atsparumą karbapenemams ir kitose enterobakterijose, pvz., *Enterobacter* spp. ir *Salmonella* spp. (Queenan ir Bush, 2007). KPC fermentai hidrolizuoja visų β -laktamų grupių antibiotikus, taip pat pastebėta, kad KPC gaminančios padermės gali būti atsparios aminoglikozidams bei chinolonams (Castanheira ir kt., 2010). KPC karbapenemazes koduojantys genai įprastai yra pernešamose plazmidėse, ir ši ypatybė β -laktamazėms suteikia didelį potencialą išplisti tarp įvairių patogeninių bakterijų rūšių (Queenan ir Bush, 2007; Naas ir kt., 2005).

Vieni iš labiausiai paplitusių ir kliniškai svarbiausių – MBL *bla*_{VIM} ir *bla*_{IMP} genai – dažniausiai yra I klasės integronų sudėtyje genų kasečių pavidalu. MBL skaidymo spektras labai platus – dauguma šių fermentų be karbapenemų, taip pat geba hidrolizuoti cefalosporinus ir penicilinus (Queenan ir Bush, 2007). Dažniausiai MBL koduojantys genai nustatomi klinikinėse *P. aeruginosa* padermėse, tačiau taip pat stebimas nemažas jų indėlis į atsparumo karbapenemams pasireiškimą *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose (Gupta ir kt., 2011; Queenan ir Bush, 2007).

Ypatingai didelį susirūpinimą kelia naujausio, tik 2009 m. aptikto MBL tipo – NDM (angl. *New Delhi Metallo- β -lactamase*) šeimos fermentų nulemtas atsparumo karbapenemams plitimas tarp kliniškai svarbių Gram neigiamų bakterijų rūšių (Yong ir kt., 2009). *bla*_{NDM} genai labiausiai paplitę tarp *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų (ypač *K. pneumoniae* ir *E. coli*), tačiau nustatomi ir *P. aeruginosa* bei *A. baumannii* bakterijose (Nordmann ir kt., 2011). NDM β -laktamazės gaminančios bakterijos atsparios beveik visiems antibiotikams, o veiksminga *bla*_{NDM} genų pernaša IncL/M, IncA/C, FII grupių plazmidėmis bei kitų enterobakterijų tipų plazmidėmis tarp įvairių Gram neigiamų bakterijų įrodyta ir eksperimentiškai (Potron ir kt., 2011; Nordmann ir kt., 2011).

A. baumannii atsparumą karbapenemams taip pat lemia keli skirtingi būdai (Lentelė 1.2). Labiausiai paplitusios *A. baumannii* karbapenemazės priklauso CHDL grupei (Zarrili ir kt., 2009). *A. baumannii* bakterijoms natūraliai būdingas nedidelis atsparumas karbapenemams, kurį lemia chromosomoje esantys *bla*_{OXA-51}-šeima genai. Jeigu prieš šiuos genus įsiterpia

insecinė seka IS*Abal*, turinti reguliacinių DNR sekų, *bla*_{OXA-51-šeima} raiška išauga ir atsparumas karbapenemams pasiekia kliniškai reikšmingą lygį (Turton ir kt., 2006). OXA-23, OXA-24/40 ir OXA-58 šeimoms priklausančios CHDL yra svarbiausios ir labiausiai paplitusios atsparumo karbapenemams determinantės *A. baumannii* bakterijose, o jas koduojantys genai dažnai nustatomi ir plazmidėse (Lentelė 1.2; Poirel ir kt., 2010b). *bla*_{OXA-23-šeima} ir *bla*_{OXA-58-šeima} genų raiška taip pat gali būti valdoma prieš juos įsiterpant insecinėms sekoms IS*Abal*-3 (Zarrilli ir kt., 2009; Poirel ir kt., 2010b).

Lentelė 1.2 *A. baumannii* atsparumą karbapenemams suteikiančios determinantės (pagal Zarrilli ir kt., 2009; Poirel ir kt., 2010b).

Atsparumo mechanizmas	Atsparumo genai	Genetinė lokalizacija
CHDL	<i>bla</i> _{OXA-23} šeima <i>bla</i> _{OXA-24/40} šeima <i>bla</i> _{OXA-58} šeima	Chromosoma/plazmidė
	<i>bla</i> _{OXA-143}	Plazmidė
	<i>bla</i> _{OXA-51} šeima	Chromosoma
MBL	<i>bla</i> _{IMP-1, -2, -4, -5, -6, -11} <i>bla</i> _{VIM-2} <i>bla</i> _{SIM-1}	I klasės integronai
Išorinės membranos baltymų pokyčiai	<i>carO</i> <i>oprD</i>	Chromosoma
Antibiotikų taikinio raiškos pokyčiai	<i>pbp-2</i>	Chromosoma

Pastaraisiais metais didelį susidomėjimą kelia *A. baumannii* plazmidžių gebėjimas įgyti CHDL koduojančius genus ir su tuo susiję rekombinacijos mechanizmai (Towner ir kt., 2011). Pastebėta, kad *bla*_{OXA-58-šeima} genai plazmidėse būna apsupti 27 bp dydžio Re27 sekų. Tai leidžia manyti, kad tokios sekos gali būti *bla*_{OXA-58-šeima} genų įterpimo taikiny. Re27 sekų yra *A. baumannii* plazmidėse, todėl tokios plazmidės yra potencialūs genetiniai elementai įgyti ir pernešti atsparumą karbapenemams lemiančius genus (Poirel ir Nordmann, 2006; Zarrilli ir kt., 2008). Panašios sekos nustatytos ir *bla*_{OXA-24/40-šeima} turinčiose plazmidėse. OXA karbapenemazes koduojantys genai yra apsupti 28 bp dydžio XerC/XerD rekombinazių atpažinimo sekomis, todėl manoma, kad *bla*_{OXA-24/40-šeima} pernešančių *A.*

baumannii plazmidžių genetinės organizacijos susidaryme svarbų vaidmenį atlieka XerC/XerD rekombinacijos sistema (D'Andrea ir kt., 2009; Merino ir kt., 2010). Tikėtina, kad panašios sistemos gali veikti ir plazmidėms įgyjant *bla*_{OXA-23}-šeima genus (Towner ir kt., 2011).

1.3.3 Integronai – dauginio atsparumo antibiotikams nešikliai

Integronai žinomi jau daugiau nei 20 metų (Stokes ir Hall, 1989). Per tiek laiko sukaupta daug duomenų, liudijančių, kad jie, greičiausiai, reikšmingai įtakojo daugelio Gram neigiamų, o taip pat ir Gram teigiamų bakterijų DAA, išplitusį ne tik bakterijų genčių viduje, bet ir tarp genčių (Rowe-Magnus ir Mazel., 2002). Integronuose esančių genų, lemiančių atsparumą antibiotikams, įvairovė labai apsunkina bakterijų sukeltų infekcijų gydymą, kelia problemų kuriant naujus antibakterinius vaistus.

Antibiotikus pradėjus vartoti klinikoje, bakterijų atsparumo vienam antibiotikui fenotipas nekėlė nuostabos, o atsparumas buvo siejamas su pavienėmis mutacijomis. Tuo tarpu bakterijų dauginio atsparumo keliems vaistams fenotipas buvo netikėtas, nes iki tol manyta, kad kelioms mutacijoms spontaniškai atsirasti per trumpą laikotarpį yra evoliuciškai neįmanoma (Davies, 1994; Mazel, 2006). Tačiau praėjus vos šešeriems metams nuo to laiko, kai klinikoje buvo pradėti naudoti streptomocinas, tetraciklinas ir chloramfenikolis, buvo aptiktos *S. dysenteriae* padermės, atsparios visiems trimis minėtiems antibiotikams, o taip pat ir sulfonamidams, kartu (Mitsubishi ir kt., 1961; Mazel, 2006). Tapo aišku, kad DAA negali būti siejamas vien tik su genetinėmis mutacijomis. Tik vėliau buvo suprasta, kad DAA ir jo plitimas tarp bakterijų dažnai susijęs su pernešamomis plazmidėmis ir jose esančiais transpozonais (Liebert ir kt., 1999; Cambray ir kt., 2010). Galiausiai, XX a. 9-ojo dešimtmečio pabaigoje R. Hall ir H. Stokes atrado integronus, kaip potencialius įvairių genetinių determinančių nešiklius (Stokes ir Hall, 1989).

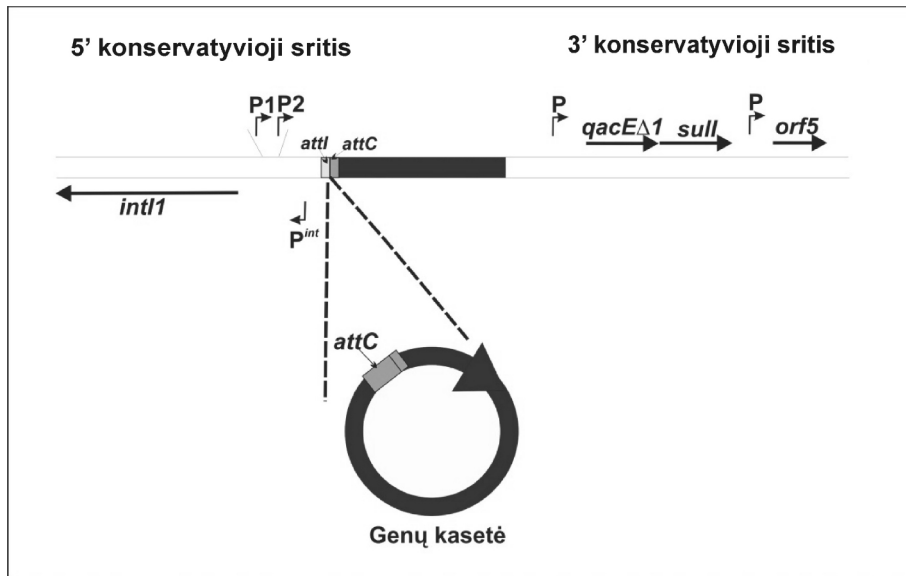
Integronai, turintys atsparumo antibiotikams genus, pirmiausia buvo aptikti klinikinėje aplinkoje. Sąlyginai paprasta jų struktūra yra labai veiksminga genetinė platforma mobilizuojant bakterijų aplinkoje sutinkamas

genų kasetes, kurios dažniausiai turi atsparumą įvairiems antibiotikams lemiančių genų, užtikrinant jų raišką ir tokiu būdu įgaunant naujų fenotipinių savybių, leidžiančių prisitaikyti prie kintančios aplinkos (Boucher ir kt., 2007). Integronai nėra reti genetiniai elementai. Kai kuriais duomenimis, juos gali turėti apie 17 % bakterijų rūšių, kurių genomo informacija yra žinoma (Cambray ir kt., 2010).

1.3.3.1 Integronų genetinė struktūra

Integronas yra linijinis DNR fragmentas, sudarytas iš dviejų konservatyvių dalių (1.4 pav.). Tarp jų yra įsiterpęs kintamo ilgio fragmentas – kintamoji sritis (angl. *variable site*, VS), turinti vieną ar kelias genų kasetes lemiančias atsparumą antibiotikams ir kitokius genetinius elementus (Hall ir Stokes, 1993; Collis ir Hall, 1995) (1.4 pav.). 5'-konservatyvioje srityje (5'-KS) yra genas *intI*, koduojantis fermentą DNR integrazę, greta jo yra rekombinacijos sritis *attI*. 5'-KS integrono dalyje yra promotoriai P1 ir P2, nuo kurių vyksta visų integrone esančių genų raiška (Hall ir Stokes, 1993; Collis ir Hall, 1995).

3'-konservatyvios srities (3'-KS) struktūros samprata pastaruoju metu keičiasi. Pradžioje manyta, kad 3'-KS yra atsparumą etidžio bromidui lemiantis genas *qacEΔI*, atsparumą sulfonamidams lemiantis genas *sulI* (koduoja dihidropteorato sintazę) ir neaiškios funkcijos atviras skaitymo rėmelis *orf5* (Fluit ir Schmitz, 1999). Tačiau kai kuriuose integronuose 3'-KS dalyje gali būti *sulI* geno duplikacija, įmanomos *qac* ir *orf5* genų delecijos arba 3'-KS dalies iš viso nėra (Stokes ir kt., 1993; Yu ir kt., 2003; Gillings ir kt., 2008; Partridge ir kt., 2009).



1.4 pav. Integrono genetinės struktūros schema (pagal Fluit ir Schmitz, 2004).

Genų, lemiančių atsparumą antibiotikams, kasetės aptinkamos ne visuose integronuose, neretai nustatomi ir „tušti“ integronai, kai tarp konservatyvių integrono dalių nėra jokių genų (Schmidt ir kt., 2001; Meng ir kt., 2011). *intI* geno koduojama integrazė IntI priklauso tirozino rekombinazių šeimai ir būtent ji dalyvauja įterpiant arba šalinant genų kasetes iš/į integroną (Nunes-Düby ir kt., 1998; Collis ir Hall, 1992; Collis ir kt., 1998; Léon ir Roy, 2003).

Pirmieji nustatyti integronai buvo aptikti transpozonų sudėtyje, todėl jie klaidingai buvo pavadinti judriaisiais genomo elementais (Stokes ir Hall, 1989). Šiuo metu mobiliaisiais integronais laikomi tie, kurie yra įsiterpę į pernešamas plazmides ar transpozonus ir gali būti pernešami tarp skirtingų mikroorganizmų (Fluit ir Schmitz, 2004; Mazel, 2006).

1.3.3.2 Atsparumo integronai ir super-integronai

Bakterijose randami integronai skirstomi į dvi dideles grupes (Fluit ir Schmitz, 2004; Cambray ir kt., 2010; Stalder ir kt., 2012):

- Mobilūs arba atsparumo integronai (angl. *mobile integrons/resistance integrons*; MI/RI);

- Chromosominiai arba super-integronai (angl. *chromosomal integrons/ super integrons*, CI/SI).

CI/SI integronai pasižymi išskirtinai chromosomine lokalizacija ir paprastai aptinkami jūrinėse bei dirvožemio bakterijose (Stalder ir kt., 2012). Priešingai MI/RI integronams, CI/SI integronai nėra skirstomi į klases. Šie integronai pirmiausia buvo aptikti *Vibrio cholerae* bakterijose, taip pat jie nustatyti ir kai kuriose *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Listonella* genčių rūšyse, o taip pat ir kitose gentyse (Mazel ir kt., 1998; Vaisvila ir kt., 2001; Mazel, 2006). CI/SI pasižymi savybe savyje talpinti labai didelį skaičių įvairių funkcijų genų kasečių – > 20-ies. Žinomi atvejai, kai genų kasečių skaičius viršija 200 (*Vibrio vulnificus* CI/SI integronas) (Chen ir kt., 2003; Mazel, 2006, Stalder ir kt., 2012). Nors pasitaiko ir išimčių: *Shewanella oneidensis* bakterijų CI/SI integrone rastos tik trys kasetės, o *Nitrosomonas europaea* – CI/SI integronas buvo be kasečių, kas labiau būdinga MI/RI integronams (Drouin ir kt., 2002; Léon ir Roy, 2003). Didesnioji dalis CI/SI integronuose nustatomų genų kasečių koduoja neaiškios funkcijos baltymus (jiems nerandama jokių žinomų homologų), o likę genų koduojami produktai pasižymi labai didele funkicine įvairove – tai yra fermentai, atliekantys įvairias substratų modifikacijas (acetiltransferazės, metilazės, glutationo transferazės), virulentiškumo veiksniai, toksino-antitoksino sistemos, faginės kilmės baltymai (Cambray ir kt., 2010; Boucher ir kt., 2007; Koenig ir kt., 2008). Nors kai kuriose *Vibrio* rūšyse CI/SI integronuose buvo rasti atsparumą trimetoprimui, chloramfenikoliui, ciprofloksacinui ir karbenicilinui koduojantys genai (*dfr*, *catB*, *qnr*, *carb*), vis dėlto manoma, kad pagrindinės CI/SI integronų genų kasečių koduojamų baltymų funkcijos susijusios su sąveika su biotiniaisiais ir abiotiniaisiais aplinkos veiksniais (Cambray ir kt., 2010).

MI/RI integronai dažniausiai randami kitų mobilių genomo elementų – transpozonų – sudėtyje, ir beveik visuomet perneša genų kasetes, koduojančias atsparumą įvairiems antibiotikams – β -laktamams, aminoglikozidams, chloramfenikoliui, trimetoprimui, streptotricinui, rifampicinui, eritromicinui, fosfomicinui, linkomicinui, chinolonams,

antiseptikams (Fluit ir Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Cambray ir kt., 2010). Kitaip nei CI/SI integronuose, MI/RI integronuose nustatomas palyginti nedidelis genų kasečių skaičius. Didžiausiame žinomame MI/RI integrone nustatytos tik aštuonios genų kasetės (Naas ir kt., 2001).

Pagal DNR integrązę koduojančias nukleotidų sekas skiriamos penkios MI/RI integronų klasės, kurios visos susijusios su atsparumo antibiotikams genų pernaša. Visų penkių klasių integronų integrązes koduojančių sekų panašumas siekia 40 – 58 % (Mazel, 2006).

I klasės integronai. Dauguma MI/RI integronų priklauso I klasei (Gillings ir kt., 2008). Šios klasės integronai aptikti *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio* ir kitų genčių bakterijose (Fluit ir Schmitz, 2004). Šie integronai paprastai yra transpozonų, kilusių iš Tn402 šeimos, sudėtyje, ir tuo pačiu gali būti įsiterpę į dar didesnius, pvz., Tn3 šeimai priklausančius transpozonus (Labbate ir kt., 2009).

II klasės integronai. Jie taip pat susiję su atsparumu antibiotikams, aptinkami Gram neigiamose bakterijose (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Acinetobacter* gentyse). Integronai beveik visais atvejais nustatomi Tn7 šeimos transpozonuose, kas taip pat užtikrina jų mobilumą (Fluit ir Schmitz, 2004). Vis dėlto pastebėta, kad Tn7 transpozonai į konjugacines plazmidės įsiterpia žymiai rečiau, todėl integronų plitimas tarp skirtingų bakterijų genčių ir rūšių yra apribotas (Labbate ir kt., 2009). Lyginant su I klasės integronais, II klasės integronų genų kasečių spektras, žymiai siauresnis; tai greičiausiai susiję su neveiklia IntI2 integrąze (plačiau – žr. 1.3.3.3 sk.; Stalder ir kt., 2012).

III klasės integronai. Jie nustatomi struktūrose, panašiose į Tn402 transpozonus. Pastarieji įsiterpę į plazmidės, tačiau jų klinikinė reikšmė labai nedidelė, nes yra labai reti. Nustatyti *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *A. xylosooxidans*, *P. putida*, *K. pneumoniae* bakterijose. Šiuose integronuose taip pat randama atsparumą antibiotikams koduojančių genų kasečių (Fluit ir Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Labbate ir kt., 2009).

Kol kas labai trūksta duomenų apie IV ir V klasės integronus. Jie nustatyti tik *V. cholerae* ir *V. salmonicida* bakterijose ir, manoma, yra susiję su bakterijų atsparumu trimetoprimui (Hochhut ir kt., 2001; Cambray ir kt., 2010).

1.3.3.3 Integrazės

Integronų 5'-KS dalyje esantys genai *intI* koduoja integrazes, kurios katalizuoja genų kasečių įterpimą ir šalinimą į/iš integrono VS. Kaip minėta anksčiau, pagal *intI* genų nukleotidų sekų skirtumus žinomos penkios skirtingos integrazės, IntI1-5 (Mazel, 2006). Visos jos priklauso tirozino rekombinazių šeimai. Šiems baltymams būdingos RHRY aminorūgščių sekos konservatyviuose motyvuose (Fluit ir Schmitz, 2004). Integrazės skiriasi nuo kitų tirozino rekombinazių šeimos baltymų, nes turi papildomą ~35–40 aminorūgščių ilgio domeną, kuris, manoma, svarbus DNR prisijungimui, o likusi fermento dalis pasižymi rekombinazės aktyvumu (Messier ir Roy, 2001).

I ir II klasių integronų integrazių IntI1 ir IntI2 aminorūgščių sekų homologija nesiekia 50 % (Fluit ir Schmitz, 2004). IntI2 baltymą koduojančiame gene 179 kodone esanti *nonsense* mutacija lemia II klasės integronų integrazės neveiklumą. Parodyta, kad šį defektą galima atitaisyti pakeičiant minėtą kodoną glutamo aminorūgštį koduojančiu kodonu, taip visiškai atstatant rekombinazės aktyvumą (Hansson ir kt., 2002).

Nors I ir II klasės integronuose nustatomos tokios pačios genų kasetės, *intI2* geno koduojama integrazė nesugeba įterpti/šalinti genų kasečių į/iš II klasės integronų. Manoma, kad už tai atsakinga galėtų būti I klasės integronų koduojama integrazė IntI1 (Fluit ir Schmitz, 2004). Šią prielaidą netiesiogiai patvirtina tai, kad I ir II klasių integronai neretai randami tose pačiose bakterijų padermėse. Kita teorija teigia, kad *intI2* gene, kuris dažnai yra Tn7 kilmės transpozonuose, retsykais vyksta natūrali *ochre179* kodono supresija, todėl yra įmanoma funkcionalaus IntI2 baltymo sintezė (Cambray ir kt., 2010). Šią hipotezę paremia ir tai, kad pastaraisiais metais vis dėlto buvo nustatyta keletas II klasės integronų su funkcionalia IntI2 integraze (Barlow ir Gobius, 2006;

Márquez ir kt., 2008). IntI2 integrazės neveiklumas galbūt paaiškina ir nedidelę įterpiamų genų kasečių, nustatomų II klasės integronuose, įvairovę. Jos biologinė funkcija bakterijose lieka neaiški, manoma, kad neveiklus IntI2 baltymas galbūt gali atlikti reguliacinį vaidmenį, nes jame lieka nepažeistas integrazės būdingas DNR prisijungimo domenas (Fluit ir Schmitz, 2004; Hansson ir kt., 2002).

III klasės integronų integrazės IntI3 savybės labai panašios IntI1 savybės. Šios klasės integrazės geba atpažinti *attI* ir skirtingų genų kasečių *attC* rekombinacines sekas, taip įterpdamos ir šalindamos genų kasetes III klasės integronuose (Fluit ir Schmitz, 2004; Cambray ir kt., 2010; Rowe-Magnus ir kt., 2001).

Kol kas nedaug žinoma apie IntI4 ir IntI5 integrazes. Kaip minėta, šias integrazes koduojantys genai rasti tik *Vibrio* genties bakterijose esančiuose integronuose, todėl jos dar yra vadinamos VIntI integrazėmis (Fluit ir Schmitz, 2004). Lyginant CI/SI ir MI/RI integronų integrazes, matyti, kad pagal aminorūgščių sekas jos pasižymi heterogeniškumu, tačiau buvo parodyta, kad abiejų tipų integronų integrazių funkcinis aktyvumas panašus – CI/SI integrazės taip pat geba sėkmingai įterpti/pašalinti genų kasetes (Rowe-Magnus ir kt., 2001).

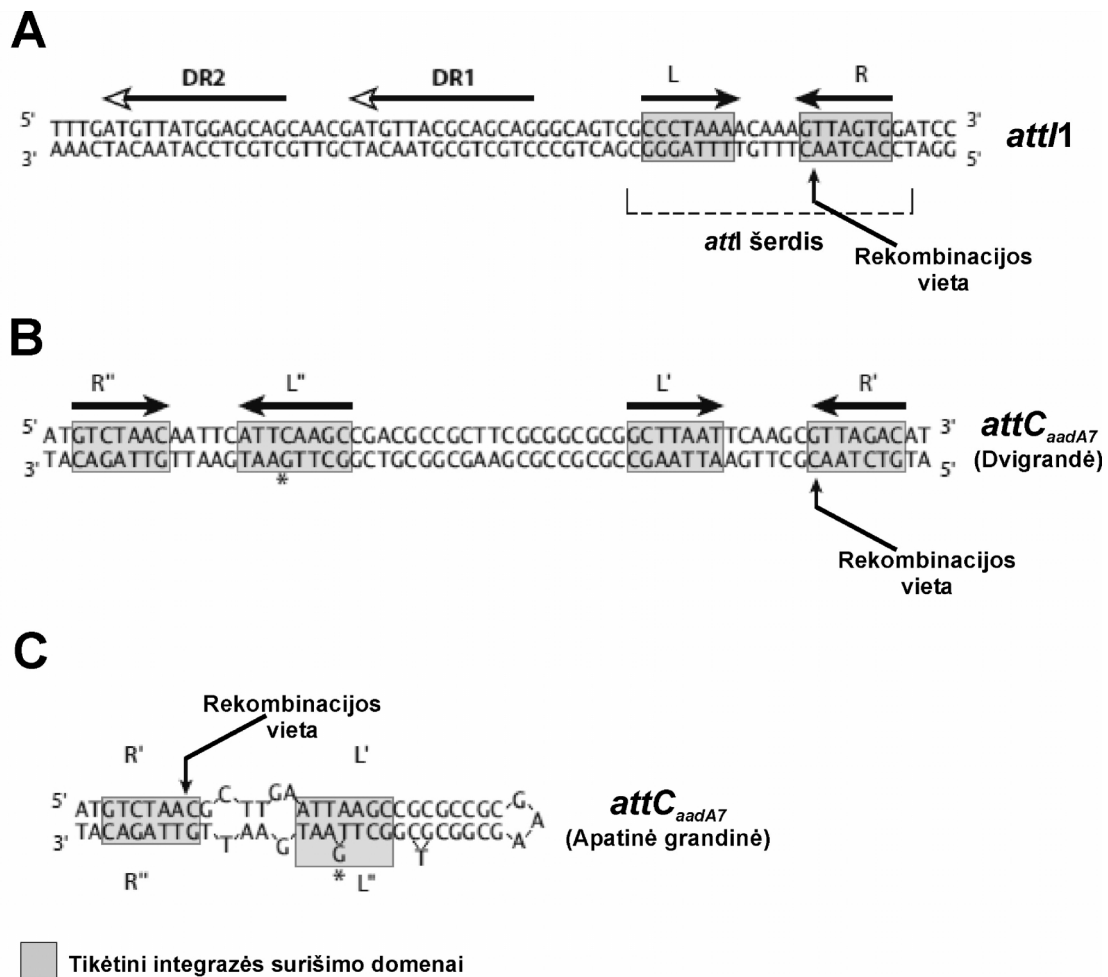
1.3.3.4 Genų kasečių įterpimas į integroną

Genų kasetė paprastai apibūdinama kaip DNR seka, egzistuojanti laisvoje žiedinėje formoje arba įsiterpusi į kitą genetinę struktūrą – integroną. Bakterijose genų kasetės dažnai savyje talpina genus, lemiančius atsparumą įvairiems antibiotikams (Partridge ir kt., 2009). Ne integronų sudėtyje esančios genų kasetės paprastai neturi promotorių, nėra transkribuojamos, todėl yra neaktyvios. Be funkcinį baltymą koduojančios dalies, taip pat genų kasetė turi ir rekombinacijos vietą *attC* (Partridge ir kt., 2009). Genų kasečių įterpimui vietai savitos rekombinacijos būdu būtini du jos taikiniai – pagrindinė rekombinacijos vieta *attI*, esanti integrono 5'-KS dalyje ir *attC* sekos esančios

įterpiamose genų kasetėse bei pačią rekombinacijos reakciją katalizuojantis fermentas – integrazė (Mazel, 2006).

Įprastą tirozino rekombinazių rekombinacijos vietą sudaro pora labai konservatyvių 9 – 13 bp ilgio invertuotų prisijungimo sekų, kurias skiria 6 – 8 bp ilgio centrinė dalis (Grindley ir kt., 2006). Integronų *attI* sritį sudaro dvi integrazės jungimosi vietos L ir R (ne visiškai invertuoti pasikartojimai), atskirtos kintama centrine sritimi (1.5 pav., A). Parodyta, kad integrazė jungiasi ne tik prie L ir R sričių, bet ir prie tiesioginius pasikartojimus turinčių DR1 ir DR2 sričių, esančių į kairę nuo *attI* šerdies (Collis ir kt., 1998; Gravel ir kt., 1998), tačiau pastarųjų dviejų sričių vaidmuo rekombinacijoje lieka neaiškus (Cambray ir kt., 2010). Rekombinacija vyksta R srityje, ties konservatyviu 5'-GTT-3' tripletu tarp G ir TT nukleotidų (Cambray ir kt., 2010) (1.5 pav., A).

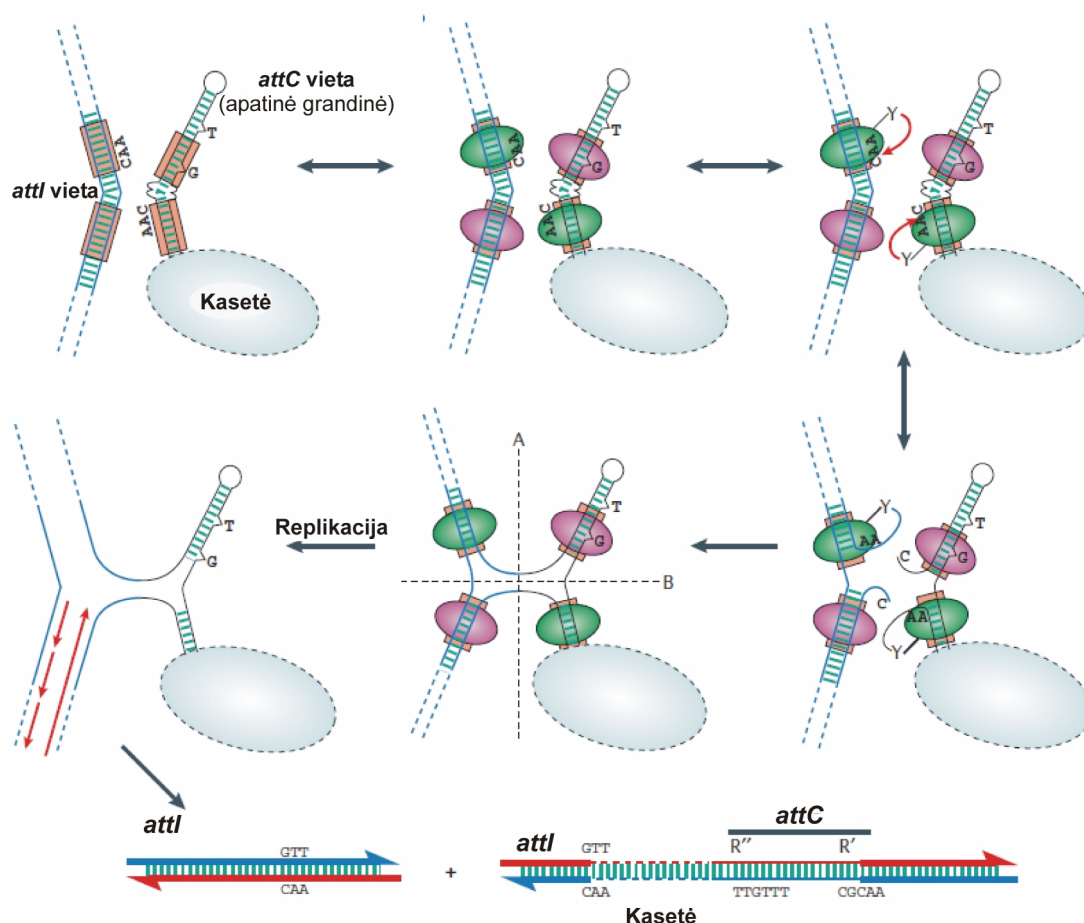
Integronuose esančių arba laisvoje žiedinėje formoje sutinkamų genų kasečių rekombinacijos vietos *attC* (anksčiau vadintos 59-bazių elementais) nėra konservatyvios ir gali smarkiai skirtis savo nukleotidų sekos ilgiu. Jų dydis svyruoja nuo 55 bp (*oxa-118* kasetė) iki 141 bp (*imp-15* kasetė) ilgio, tačiau dažniausiai sutinkama „klasikinio“ apie 60 bp dydžio *attC* (Partridge ir kt., 2009). Lyginant su *attI* rekombinacijos vieta, *attC* pasižymi sudėtingesne struktūra (1.5 pav., B). Ją sudaro dvi šerdinės sritys R''-L'' ir L'-R', prie kurių, spėjama, jungiasi integrazė, atskirtos centrine sritimi, kurios ilgio variabilumas ir lemia visos *attC* srities didelę ilgių variaciją (Mazel, 2006). Centrinė sritis skiriasi savo ilgiu, turi palindrominę struktūrą ir poruojantis tarpusavyje abiemis DNR grandinėms, gali sudaryti kryžiaus pavidalo struktūras (Cambray ir kt., 2010). Rekombinacija, kaip ir *attI* atveju, vyksta *attC* gale, R' srityje tarp G ir T nukleotidų konservatyviame 5'-GTT-3' triplete (1.5 pav., B). Šis tripletas kartu su R'' srityje esančiu tripletu 5'-AAC-3', yra konservatyvūs daugelio genų kasečių *attC* vietų elementai (Cambray ir kt., 2010).



1.5 pav. Integronų rekombinacijos vietų struktūra (pagal Cambray ir kt., 2010). **A** – dvigrandinė *attI1* rekombinacijos vieta; **B** – dvigrandinė *attC* rekombinacijos vieta (geno kasetė *aadA7*); **C** – dvigrandinės *attC* rekombinacijos vietos spėjama antrinė struktūra (geno kasetė *aadA7*).

Kitaip nei kitų tirozino šeimos rekombinazių katalizuojamose reakcijose, dalyvaujant integrazei, dvigrandinė *attI* sritis rekombinuoja su viengrandine *attC* sritimi (dalyvauja apatinė *attC* grandinė, sudaranti „išpūstą“ segtuko formos struktūrą (1.5 pav., C)). Tokiu būdu vyksta tik vienos grandinės pakeitimas (Bouvier ir kt., 2005; Partridge ir kt., 2009; Cambray ir kt., 2010). Taigi, sėkmingą rekombinaciją lemia ne *attC* nukleotidų seka, o jos sudaroma antrinė struktūra, kuriai yra svarbūs aukščiau minėti konservatyvūs nukleotidų trejetai 5'-GTT-3' ir 5'-AAC-3'. Manoma, kad integrazės savitam *attC* srities apatinės grandinės atpažinimui labai svarbūs du nukleotidai (G ir T, 1.5 pav., C), išsikišę iš *attC* „apatinės“ grandinės sudarytos struktūros (Johansson ir kt., 2004). Šie du nukleotidai sąveikauja su hidrofobinėmis

„kišenėmis“, kurias sudaro visų integrazių konservatyvios aminorūgštys (MacDonald ir kt., 2006). Susidariusiai tarpinei Holidėjaus jungčiai išardyti reikalingas papildomas replikacijos etapas (Bouvier ir kt., 2005; Partridge ir kt., 2009). Mazel ir kolegų pasiūlyta (Mazel, 2006) apibendrinta *IntI* integrazės katalizuojamos vietai savitos rekombinacijos reakcijos supaprastinta schema pateikta paveiksle 1.6.



1.6 pav. Genų kasetės rekombinacijos modelis (pagal Mazel, 2006).

Daugiausia tyrinėtas I klasės integrazės katalizuojamas rekombinacijos mechanizmas (Fluit ir Schmitz, 2004). I klasės integrazė *IntI* gali katalizuoti rekombinacijos reakcijas, dalyvaujant nedidelio panašumo *attC* sekoms, t.y., įvairių genų kasečių *attC* sekoms. Yra įrodytos 5 galimos rekombinacijos reakcijos: trys iš jų vyksta dalyvaujant įprastoms rekombinacijos vietoms – *attI* x *attC*, *attC* x *attC*, *attI* x *attI* (Cambray ir kt., 2010). Likusiose dviejose reakcijose dalyvauja *attI* arba *attC* kartu su

nesavitosiomis GTT motyvus turinčiomis sekomis, tačiau šių reakcijų efektyvumas yra labai mažas (Mazel, 2006). Veiksmingiausia yra *attI* x *attC* tipo rekombinacijos reakcija, kurios metu genų kasetė yra įterpiama iš karto prieš promotorių, esančių 5'-KS dalyje (Collis ir kt., 2001). Nėra patvirtinta, kad būtent šiuo rekombinacijos būdu (*attI* x *attC*) galėtų vykti genų kasečių šalinimas iš integronų VS (Cambray ir kt., 2010). Taip pat nustatyta, kad *attI* x *attI* tipo rekombinacija yra žymiai mažiau veiksminga, nei *attC* x *attC* (Collis ir kt., 2001). Pastarosios rekombinacijos metu, dviems *attC* sritims esant tame pačiame genų kasečių rinkinyje, vyksta genų kasetės pašalinimas iš integrono VS, sudarant kovalentiškai sujungtą žiedinę genų kasetės formą (Cambray ir kt., 2010). Lyginant genų kasečių įterpimo (*attI* x *attC* rekombinacija) ir šalinimo (*attC* x *attC* rekombinacija) veiksmingumą, nustatyta, kad šiek tiek veiksmingesnis yra kasečių įterpimas (Fluit ir Schmitz, 2004). I klasės integrasė IntI1 taip pat gali rekombinuoti genų kasečių *attC* sritis ties *attI2* ir *attI3* elementais, tiesa, gerokai mažesniu veiksmingumu, nei ties *attI1* (Collis ir kt., 2002). Kol kas nėra aišku, ar veiksmingai rekombinacijai įvykti užtenka vienintelės integrasės ir nereikalingi jokie kiti papildomi baltymai.

CI/SI integronų genų kasečių rekombinacijos sekos pasižymi savitumu rūšiai, jos rūšies viduje yra žymiai konservatyvesnės, nei MI/RI integronų kasečių *attC* elementai (Mazel, 2006). Tai aiškinama tuo, kad CI/SI integronų integrasės pasižymi didesniu savitumu į integroną įterpiamoms genų kasetėms, lyginant su MI/RI integronų integrasėmis (Mazel, 2006).

1.3.3.5 Genų kasečių ir integrasės geno raiška

Genų kasetėse esančių atsparumo genų raiška detaliausiai išnagrinėta I klasės integronuose. Kaip jau buvo minėta, beveik visos MI/RI integronuose sutinkamos genų kasetės neturi promotorinių sekų. Jų transkripcija priklauso nuo integronų 5'-KS esančių promotorių P1 ir P2 (1.4 pav.) (Collis ir Hall, 1995). P1 seka aptinkama Int1 integrasę koduojančiame gene *intI1*, o P2 – *attI* rekombinacijos srityje (Cambray ir kt., 2010). Šiuo metu žinoma bent 13 P1 variantų ir trys P2 variantai, o tuo pačiu – bent 20 skirtingų abiejų promotorių

derinių (Jovè ir kt., 2010). Svarbu pažymėti, kad P2 promotoriai įprastai yra neaktyvūs, nes turi netipiską sritį tarp –35 ir –10 elementų (Collis ir Hall, 1995). Iš daugiau nei 20 žinomų P1–P2 variantų, labiausiai paplitę penki, kurie skiriasi sąlyginiu promotoriaus stiprumu nuo vieno iki 25 kartų (Jovè ir kt., 2010). Taip pat pastebėta įdomi koreliacija – kuo promotorius silpnesnis, tuo stipresnis integrazės genų kasečių šalinimo aktyvumas (Cambray ir kt., 2010). Tai greičiausiai susiję su tuo, kad P1 sekos variacijos pakeičia integrazės baltymo seką, tuo pačiu pakeisdamos ir jos funkcines savybes (Jovè ir kt., 2010).

Nuo P1–P2 promotorių transkripcijos metu susintetinto RNR transkripto ilgis labai skiriasi, gali vykti tik pirmos genų kasetės transkripcija, tačiau gali būti sintetinamas ir visas kelių kasečių transkriptas (Cambray ir kt., 2010). Iškelta hipotezė, kad genų kasečių *attC* sričių sudaroma segtuko formos struktūra gali tarnauti kaip transkripcijos terminatorius, tačiau ji lieka labai diskutuotina (Cambray ir kt., 2010). Vis dėlto visuotinai pripažįstama, kad genų kasečių raiška labai priklauso nuo jų padėties integrone promotorių atžvilgiu – priklausomai nuo promotorių stiprumo, didžiausia raiška vyksta pirmųjų 2 – 3 kasečių, esančių iš karto už promotorinių sekų P1–P2, tolimesnės genų kasetės praktiškai yra netranskribuojamos (Partridge ir kt., 2009). Įdomu, kad yra pastebėtas reiškinys, kai esant atitinkamo antibiotiko atrankiam spaudimui, genų kasetės gali „peršokti“ iš tolimesnės promotoriaus atžvilgiu į pirmąją poziciją (Rowe-Magnus ir kt., 2002).

Veiksmingai baltymo sintezei transliacijos metu būtinos ribosomų prisijungimo sritys (angl., *ribosome binding site*, RBS). Kai kurios genų kasetės prieš koduojamą geno dalį turi šias sekas, tačiau dalis jų – ne (Cambray ir kt., 2010). I klasės integronuose, kai juose esančios genų kasetės neturi RBS, *attI* srityje sutinkamas mažas atviras skaitymo rėmelis *orf11*, koduojantis 11 aminorūgščių peptidą, prieš kurį yra funkcionali RBS. Minėtasis *orf* perkloja *attI* rekombinacijos vietą, todėl jei pirmoji integrono geno kasetė turi tinkamą terminacijos kodoną, ORF11 transkripto transliacijos kompleksas, manoma, inicijuoja ir pirmosios kasetės transkripto transliaciją (Hanau-Berçot ir kt.,

2002; Cambray ir kt., 2010). Taip pat manoma, kad panašūs maži ORF, esantys *attC* srityse, gali inicijuoti tolimesnių integrono kasečių transkriptų transliaciją (Jacquier ir kt., 2009; Cambray ir kt., 2010).

Iki šiol beveik nebuvo nieko žinoma apie integrazes koduojančių genų *intI* raiškos reguliaciją. Neseniai Guerin ir kt. (2009) parodė, kad integronų koduojamų integrasių raiškos reguliacijoje pagrindinį vaidmenį atlieka SOS atsakas (Guerin ir kt., 2009). Išanalizavus CI/SI ir MI/RI integronų DNR sritis, esančias prieš geną *intI*, buvo nustatyti konservatyvūs motyvai, persiklojantys su *intI* promotorių sekų –10 elementu ir atitinkantys *E. coli* LexA baltymo surišimo vietas. LexA yra kaip SOS atsako genų transkripcijos slopiklis (Guerin ir kt., 2009; Cambray ir kt., 2010). Indukavus SOS atsaką, I klasės integronuose ir *V. cholerae* CI/SI integrone reikšmingai padidėjo integrasės geno raiška, o tuo pačiu – ir integrasės baltymo katalizuojamos rekombinacijos reakcijos veiksmingumas. Be to, indukavus SOS atsaką, genų kasečių šalinimo dažnis iš integrono kintamosios dalies išaugo 141 – 340 kartų (Guerin ir kt., 2009). Neseniai paaiškėjo, kad SOS atsaką sukelti gali ne tik DNR pažaidos, tačiau ir tokie plačiai klinikoje vartojami antibiotikai kaip fluorochinolonai, trimetoprimas ar β -laktamai (Cambray ir kt., 2010). Todėl tampa akivaizdu, kad genų kasečių, lemiančių atsparumą įvairiems antibiotikams, rekombinacijai į/iš integrono reikšmingą įtaką daro atrankus antibiotikų spaudimas, o nesant tokio spaudimo (SOS atsako nėra) – integrono genų kasečių sudėtis ir išsidėstymas mažai kinta (Cambray ir kt., 2010).

1.3.3.6 Integronų genų kasečių epidemiologija

Daugumoje klinikinės kilmės Gram neigiamų bakterijų, atsparių antibiotikams, nustatomi I klasės integronai (Gillings ir kt., 2008). Iki šiol jau yra nustatyta daugiau nei 130 skirtingų kasečių, koduojančių atsparumą antibiotikams, ir virš 60 kasečių, kuriose esantys genai koduoja neaiškios funkcijos baltymus (Partridge ir kt., 2009). Ši įvairovė lemia atsparumą bene visų klasių antibiotikams, tarp jų visiems žinomiems β -laktamams, aminoglikozidams, makrolidams, cefalosporinams, chloramfenikoliui,

trimetoprimui, streptotricinui, rifampinui, eritromicinui (Mazel, 2006). Genų kasečių skaičius integrone gali būti labai įvairus, dažniausiai vyrauja 2 – 3 kasečių rinkiniai (Partridge ir kt., 2009). Derinių įvairovė labai didelė, jų suskaičiuojama daugiau nei 300, tačiau didesnioji dalis nustatyta tik pavieniais atvejais, o epidemiologiškai svarbių ir pasauliniu mastu paplitusių integronų kasečių kombinacijų yra palyginti nedaug (Partridge ir kt., 2009). Lieka atviras klausimas, kodėl vieni kasečių rinkiniai yra „sėkmingi“ ir labai paplitę, tuo tarpu kiti – sutinkami tik pavieniais atvejais. Manoma, kad tai lemia kelių palankiai susiklosčiusių veiksnių derinys – stiprus integrono promotorius, dėl ko vyksta pakankama integrono genų raiška, kasečių *attC* sritys, sudarančios funkcionalias antrines struktūras, papildomi elementai (pvz., RBS sekos) genų kasetėje, antibiotikų spaudimas, kuriam pasipriešinti bakterijų išgyvenimui tampa reikšmingas integrono genų suteikiamas fenotipas, sėkmingą pernašą užtikrinantys kiti mobilūs elementai, kuriuose įsiterpę integronai (Partridge ir kt., 2009).

Daugiau nei pusė (apie 60 %) iki šiol nustatytų I klasės integronų yra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* ir *A. baumannii* bakterijose (Partridge ir kt., 2009) (Lentelė 1.3). Integronuose vieni iš labiausiai paplitusių yra *aadA* šeimos genai, koduojantys adeniltransferazes ir lemiantys atsparumą aminoglikozidų klasės atstovams streptomycinui ir spektinomycinui (Fluit ir Schmitz, 2004) ir *dfr* genai, koduojantys dihidrofolato reduktazes, lemiantys atsparumą trimetoprimui. Tai nėra netikėta, nes trimetoprimo-sulfametoksazolo kombinacija antimikrobinėje terapijoje naudojama ~50 metų (van Hoek ir kt., 2011; Fluit ir Schmitz, 2004). Streptomocinas, kaip antibakterinis preparatas, taip pat žinomas jau beveik 70 metų (Vakulenko ir Mobashery, 2003).

Pastebima, kad greičiausiai dėl gausaus antibiotikų vartojimo integronuose nustatoma vis daugiau naujų atsparumą antibiotikams lemiančių genų (Partridge ir kt., 2009; Fluit ir Schmitz, 2004; Rowe-Magnus ir Mazel, 2002; Fluit ir Schmitz, 1999). Įdomu tai, kad dauguma I klasės integronų vis dar išlaiko determinantes, lemiančias atsparumą streptomycinui ir spektinomycinui, nors šie antibiotikai klinikoje gana seniai nevartojami.

Aptinkamos netgi naujos genų kasetės, lemiančios atsparumą šiems aminoglikozidams, pvz. *aadA8*, kurios atsiradimą nulėmė dviejų – *aadA2* ir *aadA3* – genų kasečių rekombinacija (Peters ir kt., 2001). Tiesa, *aadA* šeimos kasetės beveik visuose I klasės integronuose yra paskutinėje pozicijoje, o tai reiškia, kad jų raiška žymiai silpnesnė, arba tiesiog nevyksta (Partridge ir kt., 2009). Tuo tarpu tokios kasetės kaip *dfr*, *aadB*, *aacA4*, *bla_{VIM-2}*, lemiančios atsparumą kliniškai svarbiems antibiotikams (trimetoprimui, gentamicinui, amikacinui, β-laktamams), nustatomos integronų VS pirmoje arba antroje pozicijoje, kas užtikrina pakankamą jų raišką (Partridge ir kt., 2009).

Tarp labiausiai paplitusių enterobakterijų I klasės integronų genų kasečių kombinacijų, dažniausiai sutinkami vieną genų kasetę turintys integronai: 600 bp *dfrA7*, 1000 bp *aadA1*, 1000 bp *aadA2*, 1200 bp *bla_{PSE-1}*; dvi kasetės - 1500 bp *dfrA1-aadA1*, 1600 bp *dfrA17-aadA5*; tris kasetes – 1800 bp *dfrA12-orfF-aadA2* (INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt/>). Didesni nei 2000 bp dydžio integronai dažnai nustatomi klinikinėse *A. baumannii* padermėse (Lentelė 1.3). *P. aeruginosa* I klasės integronai pasižymi tuo, kad juose dažniau yra genai, lemiantys atsparumą naujesniems aminoglikozidams – gentamicinui, amikacinui, tobramicinui (pvz., *aacA4*, *aadB*), taip pat atsparumą β-laktamams, tarp jų ir karbapenemams, lemiantys genai (pvz., *bla_{VIM-2}*) (Partridge ir kt., 2009; INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt/>).

Šalia dažniausių – atsparumą trimetoprimui, streptomicinui, β-laktamams lemiančių genų, integronuose taip pat aptinkama chloramfenikolio, eritromicino, linkomicino, fosfomicino, chinolonų atsparumo determinančių, taip pat nežinomos funkcijos genų (Fluit ir Schmitz, 2004; Partridge ir kt., 2009).

Lentelė 1.3 Europos šalyse dažniausiai nustatomi I klasės integronų genų kasečių deriniai *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* padermėse, išskirtose iš žmonių ir gyvūnų.

Bakterija	Integrone dydis, kb	Genų kasečių rinkinys	Atsparumas	Šalys	Literatūros šaltiniai
<i>E. coli</i>	1,5	<i>dfrA1-aadA1</i>	TMP, STR	Olandija	Vo ir kt., 2007
	1,6	<i>dfrA17-aadA5</i>		Šveicarija	Cocchi ir kt., 2007
				Prancūzija	Laroche ir kt., 2009
	1,8	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>		Turkija	Sandalli ir kt., 2010
				Vokietija	Kadlec ir Schwarz, 2008
	2,0	<i>bla_{OXA-1} – aadA1</i>	AMP, STR	Portugalija	Dubois ir kt., 2003
				Rusija	Moura ir kt., 2007
	2,1	<i>aacA4-cmlA</i>	GEN, AMI, TOB, CHL	Ispanija	Fursova ir kt., 2010
				Graikija	Ozgumus ir kt., 2007
	1,9	<i>aacA4-catB3-dfrA1</i>	GEN, AMI, TOB, CHL, TMP	Norvegija	Machado ir kt., 2008
				Guerra ir kt., 2003	
1,0	<i>aadA1</i>	STR		Vinué ir kt., 2008	
1,0	<i>aadA2</i>			Vasilakopoulou ir kt., 2009	
0,7	<i>dfrA7</i>	TMP		Sunde, 2005	
<i>S. enterica</i>	1,0	<i>aadA1</i>	STR	Olandija	Vo ir kt., 2006
				Slovakija	Majtánová ir kt., 2007
	2,0	<i>bla_{OXA-1} – aadA1</i>	AMP, STR	Portugalija	Antunes ir kt., 2004
				Airija	Daly ir Fanning, 2000
	1,2	<i>bla_{PSE-1}</i>	AMP	Vokietija	van Essen-Zandbergen ir kt., 2007
	1,5	<i>dfrA1-aadA1</i>	TMP, STR	Ispanija	
	1,8	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>		Norvegija	van Essen-Zandbergen ir kt., 2007
				Miko ir kt., 2003,2005	
1,2	<i>dfrA1-orfC</i>	TMP		Cabrera ir kt., 2006	
<i>P. aeruginosa</i>	0,7	<i>aacA4</i>	GEN, AMI, TOB	Lenkija	Patzer ir kt., 2009
	1,6	<i>aacA4-bla_{OXA}</i>	GEN, AMI, TOB, AMP	Italija	Fiett ir kt., 2006
				Prancūzija	Pallecchi ir kt., 2001
	1,5	<i>aacA4-bla_{VIM-2}</i>	GEN, AMI, TOB, CRB	Vengrija	Cholley ir kt., 2010
	1,3	<i>aadA6-orfD</i>	STR	Turkija	Libisch ir kt., 2009
				Ispanija	Ozgumus ir kt., 2007
0,7	<i>aadB</i>	KAN, GEN, TOB	Graikija	Ruiz-Martinez ir kt., 2011	
<i>A. baumannii</i>	2,5	<i>aacC1-orfX'-orf''-aadA1</i>	GEN, STR	Norvegija	Karah ir kt., 2011
				Italija	D'Arezzo ir kt., 2009
	3,0	<i>aacC1-orfX'-orfX''-orfX'''-aadA1</i>		Graikija	Giordano ir kt., 2007
				D.	
2,2	<i>aacA4-catB8-aadA1</i>	GEN, AMI, TOB, CHL, STR	Britanija	Kraniotaki ir kt., 2006	
			Airija	Turton ir kt., 2005	
			Čekija	Abbott ir kt., 2005	
				Nemec ir kt., 2004	

Kitaip nei I klasės integronuose, II klasės integronuose rasta tik ~ 10 skirtingų genų kasečių, susijusių su atsparumu antibiotikams (INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt/>). Dažniausios yra *dfrA1*, *sat1/2* ir *aadA1* kasetės, lemiančios atsparumą trimetoprimui, streptotricinui, streptomycinui. Dažniausias genų kasečių derinys – trijų kasečių 2200 bp kombinacija *dfrA – sat2 – aadA1*. Ji rasta daugumoje Gram neigiamų bakterijų, turinčių II klasės integronus, tarp jų ir *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* bei *A. baumannii* (Kadlec ir Schwarz, 2008; Fursova ir kt., 2010; Ozgumus ir kt., 2009; Cocchi ir kt., 2007; Laroche ir kt., 2009; Ramírez ir kt., 2010, 2012; van Essen-Zandbergen ir kt., 2007). Taip pat dažnesni 2500 bp *estX-sat2-aadA1* ir 1500 bp *sat2-aadA1* II klasės integronai (Kadlec ir Schwarz, 2008; Ahmed ir kt., 2005; Barlow ir Gobius, 2006; van Essen-Zandbergen ir kt., 2007). Spėjama, kad tokią nedidelę genetinių determinančių ir jų derinių įvairovę galbūt lemia jau minėtos neveiklios integracijos IntI2 (Stalder ir kt., 2012; Hansson ir kt., 2002).

Iki šiol žinomi tik keturi III klasės integronų genų kasečių deriniai, kuriuose yra atsparumą antibiotikams suteikiančių genų: 4800 bp *bla_{IMP-1} – aacA4 – bla_{TEM-1}* ir 1600 bp *bla_{IMP-1} – aacA4* III klasės integronai nustatyti *Serratia marcescens* bakterijose, 1800 bp *bla_{GES-1} – bla_{OXA}/aacA4* – *Klebsiella pneumoniae* ir *Escherichia coli*, o 1600 bp *bla_{OXA-10} – aacA4* – *Enterobacter cloacae* (Arakawa ir kt., 1995; Poirel ir kt., 2010a; INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt/>).

1.3.3.7 Integronų kilmė ir evoliucija

Remiantis integronų integracijos koduojančių genų *intI* filogenetine analize, integronus galima suskirstyti į tris dideles evoliucines grupes (Boucher ir kt., 2007). Pirmąją grupę sudaro gėlavandenių/dirvožemio proteobakterijų integronai. Jiems priskiriami ir kliniškai svarbūs I klasės integronai. Antrąją grupę sudaro jūrinių γ -proteobakterijų integronai kartu su II klasės integronais (Mazel, 2006). Trečioje grupėje yra įvairių taksonominių grupių integronai, pasižymintys viena savybe – jų 5'-KS dalyje integraciją koduojantis genas

nurašomas ta pačia kryptimi, kaip ir variabilioje dalyje esančios genų kasetės. Todėl ši grupė pavadinta „invertuotos integracijos“ grupe (Boucher ir kt., 2007). Tarp visų trijų grupių pastebimas integracijos genų „maišymasis“, kai vienai grupei būdingų integracijos genų homologai nustatomi kitai grupei priskiriamose bakterijose. Akivaizdu, kad evoliucijos eigoje integracijos genai, o kartu ir patys integronai, buvo mobilizuojami ir HGT būdu perdujami tarp skirtingų ekologinių nišų atstovų (Boucher ir kt., 2007).

Evoliuciniai tyrimai liudija, kad CI/SI integronai yra labai senos struktūros, atsiradusios bakterijų genomuose prieš kelis šimtus milijonų metų (Mazel, 2006). MI/RI ir CI/SI integronai yra identiškos struktūrinės organizacijos, o tai leidžia manyti, kad CI/SI integronai yra MI/RI integronų pirmtakas – mobilūs atsparumo integronai evoliucionavo iš super-integronų, tam tikriems mobiliems genomui elementams (pvz., transpozonomams) perėmus CI/SI integracijos *intI* geną kartu su atitinkama *attI* sritimi (Mazel, 2006). Šią versiją sustiprina keletas pastarųjų metų atradimų. *V. salmonicida* bakterijose buvo nustatyta „tarpinė“ integrono struktūra, kurios aštuonių kasetių rinkinyje, antroje pozicijoje aptiktas I ir II klasės integronuose itin paplitęs genas *dfrA1* (Mazel, 2006). Šio integrono integraciją koduojantis genas buvo artimas *Vibrio* genties bakterijų CI/SI integracijos genams, o dalies kitų genų kasetių *attC* sričių struktūra buvo panaši į tik CI/SI integronuose randamas kasetes. Šis integronas buvo aptiktas plazmidėje, greta įsiterpusių insercinių sekų. Šie faktai leidžia kelti hipotezę, kad tai galėtų būti tarpinis variantas tarp CI/SI ir MI/RI integronų, kuris evoliucijos eigoje įgijo papildomų atsparumo kasetių ir mobilių genomui elementų suformuotoje platformoje tapo „tikruoju“ MI/RI (Mazel, 2006).

Apie tai, kad MI/RI integronų koduojamos integracijos gali mobilizuoti CI/SI integronų genų kasetes dar 2002 m. diskutavo Rowe-Magnus ir kolegos (Rowe-Magnus ir kt., 2002). Be to, aplinkoje paplitusių bakterijų CI/SI integronuose pavyko nustatyti genų kasetes, kurių koduojami baltymai suteikia atsparumą tam tikriems antibiotikams (pvz., koduoja į karbenicilinas panašius baltymus), o I klasės MI/RI integronuose sutinkami šių kasetių

homologai (RSG karbenicilinazes koduojantys genai) (Mazel, 2006). Dar pastebėta, kad dalis MI/RI integronų atsparumo kasečių turi beveik identišką *attC* seką kaip ir kasetės *Xanthomonas* ir *Vibrio* super-integronuose (Rowe-Magnus ir kt., 2001). Tiesa, sudėtingesnių, daugiau nei dvi kasetes talpinančių MI/RI integronų atsiradimas siejamas ne su CI/SI, o su dviejų skirtingų paprastesnės struktūros MI/RI integronų rekombinacija (Mazel, 2006).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai ir bakterijų padermės

Darbe naudotos medžiagos, reagentai ir antibiotikai buvo gauti iš kompanijų: Sigma-Aldrich (JAV), Merck (Vokietija), Carl Roth (Vokietija), Amersham (D. Britanija), RD Systems (JAV), BIO-RAD (JAV), Hartmann Analytics (Vokietija). Darbui su DNR reikalingi reagentai ir kiti fermentai buvo gauti iš Thermo Scientific (Lietuva).

Fenotipiškai apibūdintos antibiotikams atsparios *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijos gautos iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Mikrobiologijos katedros (LSMU MK) ir Veterinarijos instituto (LSMU VI). Padermės išskirtos 2005 – 2009 m. įvairiuose šalies regionuose esančiuose gyvulininkystės kompleksuose (18 ūkių) ir gydymo įstaigose (9 ligoninės) (2.1 ir 2.2 lentelės).

Klinikinės kilmės padermės išskirtos skirtinguose ligoninių skyriuose atsitiktine tvarka iš įvairių šaltinių mėginių. *S. enterica* bakterijų padermės išskirtos iš pacientų su salmoneliozės simptomais išmatų.

Gyvūninės kilmės *E. coli* išskirtos iš galvijų (šešios fermos), kiaulių (septynios fermos) ir naminių paukščių (penkios fermos) auginimo ūkių. Visų sveikų gyvūnų bakterijų padermės išskirtos iš jų išmatų, sergančių – iš išmatų arba vidaus organų (vištų). Sergančių gyvūnų dažniausias susirgimas buvo diareja ir lėtinė kvėpavimo takų liga (vištos). Gyvūninės kilmės *S. enterica* padermės išskirtos skerdyklose iš vištienos ir kiaulienos mėginių.

Antibiotikams atsparios *A. baumannii* išskirtos 2010 – 2011 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikų (LSMU KK), Respublikinės Vilniaus universitetinės ligoninės (RVUL), Respublikinės Šiaulių ligoninės (RŠL) intensyvios terapijos ir kituose skyriuose gydytų pacientų klinikinės medžiagos mėginių (apatinių kvėpavimo takų, kraujo, šlapimo, žaizdų ir kt.) (2.3 lentelė).

Padermių atsparumas antibiotikams nustatytas ligoninėse, jos buvo iširtos kiekybinių plokštelių (Sensititre Trek, Didžioji Britanija) ir kokybinių diskų difuzijos (Kirby-Bauer metodas) į agarą metodais. Duomenys interpretuoti pagal CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) rekomendacijas.

Lentelė 2.1 Darbe tirtų *E. coli* ir *S. enterica* padermių atsparumas antibiotikams.

Išskyrimo šaltinis					Antibiotikams atsparių padermių skaičius (Atsparių padermių dalis,%)								
					Antibiotikai								
					AMP	CHL	GEN	NEO	Q	TET	STR	SUL	TMP
<i>E. coli</i>	Klinikinės kilmės (85)*				75 (88)	16 (19)	68 (80)	10 (12)	26 (31)	49 (58)	73 (86)	74 (87)	62 (73)
	A (59)	B (17)		ND (9)									
	Gyvūninės kilmės (132)**				88 (67)	39 (30)	23 (17)	6 (5)	79 (60)	95 (72)	76 (58)	94 (71)	85 (64)
	N. paukščiai		Galvijai		Kiaulės								
	Sv. (27)	Sr. (27)	Sv. (17)	Sr. (26)	Sr. (35)								
<i>S. enterica</i>	Klinikinės kilmės (37)				26 (70)	8 (21)	14 (38)	1 (3)	6 (16)	17 (46)	21 (57)	27 (73)	11 (30)
	Gyvūninės kilmės (50)				29 (58)	15 (30)	7 (14)	5 (10)	23 (46)	38 (76)	35 (70)	31 (62)	13 (26)
	Vištiena (31)		Kiauliena (19)										

AMP – ampicilinas, CHL – chloramfenikolis, GEN – gentamicinas, NEO – neomicinas, SUL – sulfametoksazolas, STR – streptomocinas, TET – tetraciklinas, TMP – trimetoprimas, Q – nalidikso r. ir/arba ciprofloksacinas.

* **A** – išskirta iš šlapimo takų ir šlapimo mėginių, **B** – išskirta iš kraujo, pūlių, žaizdų sekreto, pilvo ertmės ir kt. mėginių sekreto, **ND** – nėra duomenų apie mėginių kilmę.

** **Sv.** – sveiki, **Sr.** – sergantys.

Lentelė 2.2 Darbe tirtų *P. aeruginosa* padermių atsparumas antibiotikams.

Išskyrimo šaltinis					Antibiotikams atsparių padermių skaičius (Atsparių padermių dalis,%)									
					Antibiotikai									
					AMI	CIP	GEN	FEP	FOT	IMI	TMP	TOB	PIP	
<i>P.aeruginosa</i>	Klinikinės kilmės (111)*													
	C (50)	D (10)	E (47)	ND (4)	11 (10)	38 (34)	47 (42)	20 (18)	72 (65)	36 (32)	107 (96)	46 (41)	41 (37)	

AMI – amikacinas, CIP – ciprofloksacinas, GEN – gentamicinas, FEP – cefepimas, FOT – cefotaksimas, IMI – imipenemas, PIP – piperacilinas, TMP – trimetoprimas, TOB – tobramicinas.

* C – išskirta iš apatinių kvėpavimo takų (bronchų, bronchų sekreto, bronchų nuoplovų), D – išskirtos iš šlapimo, E – išskirta iš kraujo, pūlių, žaizdų sekreto, ND – nėra duomenų apie mėginių kilmę.

Lentelė 2.3 Darbe tirtų *A. baumannii* padermių atsparumas antibiotikams.

Išskyrimo vieta		Antibiotikams atsparių padermių skaičius (Atsparių padermių dalis,%)									
		Antibiotikai									
		AMI	CAZ	CIP	GEN	IMI	MEM	PIP	SAM	SCF	TZP
RVUL (103)		99 (96)	102 (99)	100 (98)	102 (99)	56 (54)	56 (54)	98 (95)	72 (70)	101 (98)	98 (95)
LSMU KK (304)		211 (69)	283 (93)	287 (94)	210 (69)	115 (38)	118 (39)	287 (94)	166 (55)	101 (33)	251 (83)
RŠL (37)		32 (86)	35 (95)	33 (89)	33 (89)	23 (62)	23 (62)	–	–	0 (0)	–

SCF – cefoperazonas, MEM – meropenemas, TZP – piperacilinas/tazobaktamas, SAM – ampicilinas + sulbaktamas, CAZ – ceftazidimas, GEN – gentamicinas, AMI – amikacinas, CIP – ciprofloksacinas, IMI – imipenemas, PIP – piperacilinas.

Konjugacijai naudota recipientinė *E. coli* HK225 padermė, gauta iš K. Kadlec ir S. Schwarz (Neustadt-Mariensee, Vokietija). Plazmidę pAC92 (su viena *bla*_{OXA-24/40} kopija) turinti *A. baumannii* padermė gauta iš L. Peixe (Porto, Portugalija).

Bakterijos augintos skystoje ir agarizuotoje LB (Luria-Bertani) terpėje su atitinkamu antibiotiku. Skystos terpės (pH 7,4) sudėtis: 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 10 g NaCl. Vandeniui praskiedžiama iki 1 l. Ruošiant agarizuotą LB terpę, į 1 l terpės įdedama 15 g agaro. Autoklavuojama.

2.1.2 Oligonukleotidiniai pradmenys

Darbe naudoti oligonukleotidiniai pradmenys (sekos pateiktos 2.4 lentelėje) buvo sukonstruoti naudojant internetinę programą „Primer3“ (Rozen ir Skaletsky, 2000), arba susintetinti remiantis literatūros šaltiniais. Visi pradmenys buvo sintezuoti Metabion International AG (Martinsried, Vokietija).

Lentelė 2.4 Darbe naudoti oligonukleotidiniai pradmenys.

Nustatomas genetinis elementas	Pradmuo	Pradmens seka (5'–3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
<i>intI1</i>	IntI1-F IntI1-R	CTGCGTTCGGTCAAGGTTCT GGAATGGCCGAGCAGATCCT	882	Lanz ir kt., 2003
<i>intI2</i>	IntI2-F IntI2-R	CACGGATATGCGACAAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	746	Mazel ir kt., 2000
I kl. integronų VS	5' CS 3' CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCT GA	Įvairus	Lévesque ir kt., 1995
II kl. integronų VS	Hep74 Hep51	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	Įvairus	White ir kt., 2001
<i>sulI</i>	SulI-F SulI-R	TCACCGAGGACTCCTTCTTC CAGTCCGCCCTCAGCAATATC	331	Chen ir kt., 2004
<i>mdh</i>	Mdh-F Mdh-R	TGCCAACGGAAGTTGAAGTG CGCATTCCACCACGCCCTTC	216	Lin ir Tsen, 1999
16S-23S	DT104-F DT104-R	GTCAGCAGTGTATGGAGCGA AGTAGCGCCAGGACTCGTTA	162	Pritchett ir kt., 2000
<i>thdF</i> -S001	UJ-L12 LJ-R1	ACACCTTGAGCAGGGCAAAG AGTTCTAAAGTTTCGTAGTCG	500	Boyd ir kt., 2001
S044- <i>int2</i>	104-RJ C9-L2	TGACGAGCTGAAGCGAATTG AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	515	
S044- <i>yidY</i>	104-RJ 104-D	TGACGAGCTGAAGCGAATTG ACCAGGGCAAACTACACAG	500	
AB-PBRT GR1 gr.	gr1FW gr1RV	CATAGAAATACAGCCTATAAAAG TTCTTCTAGCTCTACCAAAT	330	Bertini ir kt., 2010
AB-PBRT GR2 gr.	gr2FW gr2RV	AGTAGAACAACGTTTAATTTTATTGGC CCACTTTTTTTAGGTATGGGTATAG	851	
AB-PBRT GR3 gr.	gr3FW gr3RV	TAATTAATGCCAGTTATAACCTTG GTATCGAGTACACCTATTTTTTGT	505	

Lentelės 2.4 tęsinys

Nustatomas genetinis elementas	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
AB-PBRT GR5 gr.	gr5FW gr5RV	AGAATGGGGAACCTTTAAAGA GACGCTGGGCATCTGTAAAC	220	
AB-PBRT GR18 gr.	gr18FW gr18RV	TCGGGTTATCACAATAACAA TAGAACATTGGCAATCCATA	676	
AB-PBRT GR7 gr.	gr7FW gr7RV	GAACAGTTTTAGTTGTGAAAG TCTCTAAATTTTTTCAGGCTC	885	
AB-PBRT GR9 gr.	gr9FW gr9RV	GCAAGTTATACATTAAGCCT AAAAATAAACGCTCTGATGC	191	Bertini ir kt., 2010
AB-PBRT GR4 gr.	gr4FW gr4RV	GTCCATGCTGAGAGCTATGT TACGTCCCTTTTTATGTTGC	508	
AB-PBRT GR11 gr.	gr11FW gr11RV	GGCTATTCAAAAACAAAGTTAC GTTTCCTCTTACACTTTT	852	
AB-PBRT GR12 gr.	gr12FW gr12RV	TCATTGGTATTCGTTTTTCAAACC ATTCACGCTTACCTATTGTGC	165	
AB-PBRT GR10 gr.	gr10FW gr10RV	TTTCACTAGCTACCAACTAA ACACGTTGGTTTGGAGTC	371	
AB-PBRT GR13 gr.	gr13FW gr13RV	CAAGATCGTGAAATTACAGA CTGTTTATAATTTGGGTCGT	780	
AB-PBRT GR8 gr.	gr8FW gr8RV	AATTAATCGTAAAGGATAATGC GACATAGCGATCAAATAAGC	233	
AB-PBRT GR14 gr.	gr14FW gr14RV	TTAAATGGGTGCGGTAATTT GCTTACCTTTCAAACCTTG	622	
AB-PBRT GR15 gr.	gr15FW gr15RV	GGAAATAAAATGATGAGTCC ATAAGTTGTTTTGTTGTATTCCG	876	
AB-PBRT GR16 gr.	gr16FW gr16RV	CTCGAGTTCAGGCTATTTTT GCCATTTCAAGATCTAAAC	233	
AB-PBRT GR17 gr.	gr17FW gr17RV	AATAACACTTATAATCCTTGTA GCAAATGTGACCTCTAATATA	380	
AB-PBRT GR6 gr.	gr6FW gr6RV	AGCAAGTACGTGGGACTAAT AAGCAATGAAACAGGCTAAT	662	
AB-PBRT GR19 gr.	gr19FW gr19RV	ACGAGATACAAACATGCTCA AGTAGACATTTTCAGGCATT	815	
PBRT IncHI1	HI1 FW HI1 RV	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	Carattoli ir kt., 2005
PBRT IncHI2	HI2 FW HI2 RV	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644	
PBRT IncI1	I1 FW I1 RV	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139	
PBRT IncX	X FW X RV	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376	
PBRT IncL/M	L/M FW L/M RV	GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	
PBRT IncN	N FW N RV	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	
PBRT IncFIA	FIA FW FIA RV	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	
PBRT IncFIB	FIB FW FIB RV	GGAGTTCTGACACACGATTTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	
PBRT IncW	W FW W RV	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGC GCGCATAGAACCGT	242	
PBRT IncY	Y FW Y RV	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765	
PBRT IncP	P FW P RV	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	
PBRT IncFIC	FIC FW FIC RV	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262	

Lentelės 2.4 tęsinys

Nustatomas genetinis elementas	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
PBRT IncA/C	A/C FW A/C RV	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	Carattoli ir kt., 2005
PBRT IncT	T FW T RV	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	
PBRT IncFIIS	FIIS FW FIIS RV	CTGTGCTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	
PBRT IncFrepB	FrepB FW FrepB RV	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	270	
PBRT IncK/B	K/B FW K RV	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCC GCCAAA	160	
PBRT IncB/O	B/O RV	TCTGCGTTCGGCCAAGTTCGA	159	
<i>A. baumannii</i> ECI-III klonų nustatymas	Gr1ompAF Gr1/2ompAR	GATGGCGTAAATCGTGGTA CAACTTTAGCGATTTCTGG	355	Turton ir kt., 2007
	Gr1csuEF Gr1csuER	CTTTAGCAAACATGACCTACC TACACCCGGGTAAATCGT	702	
	Gp1OXA66 Gp1OXA66R	GCGCTTCAAAATCTGATGTA GCGTATATTTTGTTCATTCC	559	
	Gr2omp Gr1/2ompAR	GACCTTTCTTATCACAACGA CAACTTTAGCGATTTCTGG	343	
	Gr2csuEF Gr2csuER	GGCGAACATGACCTATTT CTTCATGGCTCGTTGGTT	580	
	Gp2OXA69 Gp2OXA69	CATCAAGGTCAAACCTCAA TAGCCTTTTTTCCCATC	162	
pAB120 plazmidės sekoskaita	60_R1 60_F1 60_R2 60_F2 Ins3_R Ins3_F 60_F3 60_R3 60_R3 (2) OXA-24_F OXA-24_R OXA-40_F OXA-40_R 60_F4 60_R4 60_R5 60_R6 60_F5 F_AbTRtox R_AbTRtox F_AbTRant R_AbTRant X2F X2R sepF sepR	CATAAGCGCTACTAAGACTACTAACTTGC GTAAAACCCCAACCATAGAACTACAAG CGTGGACATATAAGAGCTAAAACC CTATTCACAAGGAACAGAAAGCTACC ATTGGTTAATACCCTCAATCGGTGT GAAATGTAGTTGAGCTGATGCTTG ATGAGCTAATCAAAGTGTGGAAC CATGGATTATACAAGAATGTACAAAG AGGTTTTTGGTTGTTTTTATAGGTTT ATGAAAAAATTTATACTCCTATATTCAGC TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT ACAAAATCGGTGGCTATTCAGTGC CAACCCAAATGCCTCAAGACG CCGCATAGAGTTATCACATCAGC TTAGCAGAAGCTCTCTTACTTCG ATGGACACATAGAGAGCAGGATGC ATGTTTTTTATGGAACAGTATTTT CTTTAGCAAGCAAGCTTTGAATT ATGGTTAGATACTCACACAAAGA GCATAAAACAACCAAGCTTAATGTT GCTTTTTTCATGTTGCTGAGAAG GCACAATAGCTTGTCTGAAAGG AAATGGCTGATGAATTACTGTTGG ACTGGGCGAGTACAAGATCCC	Įvairus	Šis darbas

Lentelės 2.4 tęsinys

Nustatomas genetinis elementas	Pradmuo	Pradmens seka (5'–3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis	
<i>A. baumannii</i> MLST tipavimas	Integroneo	F2mphA	CATGGCCACGTAGAGAT	Įvairus	Šis darbas
	<i>dfrA17</i> –	R_mphA	AGTTCGTGGTGAACGACAAG		
	<i>aadA5Δ</i> – <i>IS26</i> –	FmphR	AGAAGTCGTTGCGAGTGTTT		
	<i>ΔintI1</i> – <i>aadB</i> –	RmphR	CCTGAATGCGATACCGATAG		
	<i>aadA1</i> – <i>cmlA</i> ir	RmphR_is610	GCAGTCAGAGGTAGGCTGTC		
	jo aplinkos	0	CAGGTTGCGATTGTCCTTA		
	sekoskaita	FmerA	AGAAAACGACAAGACGGGTAG		
		RmerA	CTTGGTGTGTCGTCAAAAGTGA		
		FmerP	GAGTTCAGACAGCACGGTTT		
		RmerR	CCTACACGGTATCGCAACT		
		RmerD	ACAGTGAGCTGCCAAAAC		
		RmrX	AGAAATGCTCCACGTACTC		
		F_tnpM	TTACCGTGGCAGGAAGAA		
		R_tnpR	CCCAGTGGACATAAGCCTGT		
		F9580	AGTTCGCGCTTAGCTGGATA		
		R9580	CTGATGCCGTATTTGCAGTA		
		R_IS26	GTTTACGGCTCGTTTTATGG		
		FaadB_cml	ACTCGGGAAACACAAGACAG		
		Rcml			
		Fdfr17tnpA	CGGAACAACGTGATTGAATG		
		RintcmlA	ATTGTGCTCGCTGTCGTACC		
		F-dfrcml	CGTTGAAGTCGAAGGTGATA		
		R-dfrcml	CAGAAAGTAGACTGCCGTGAC		
		Forf6_is6100	TTTTCAGAAGACGACTGCAC		
		Forf5	CTCGTCAGGATCAAACCTGC		
	<i>cpn60</i>	cpn60F	ACTGTACTTGCTCAAGC		
	cpn60R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG			
<i>fusA</i>	fusAF	ATCGGTATTTCTGKCCACATYGAT	802		
	fusAR	CCAACATAACKYTGWACACCTTTGTT			
<i>gltA</i>	gltAF	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	723		
	gltAR	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG			
<i>pyrG</i>	pyrGF	GGTGTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	434		
	pyrGR	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA			
<i>recA</i>	recAF	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	425		
	recAR	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC			
<i>rplB</i>	rplBF	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAAC	475		
	rplBR	CACCACCACRTGYGGGTGATC			
<i>rpoB</i>	rpoBF	GTTGCTGCTGCAATCAAAGA	1234		
	rpoBR	TCTCACCAAAAATTGCACGA			

2.2 Tyrimų metodai

2.2.1 Mėginių paruošimas PGR

Bakterijų kolonijos suspenduojamos 200 µl sterilaus dejonizuoto vandens. Mėginiai inkubuojami 5 min verdančio vandens vonioje ir centrifuguojami 10000 g 10 min kambario temperatūroje. Supernatantas perpilamas į švarų sterilų 1,5 ml mėgintuvėlį ir saugomas –20 °C temperatūroje. Transportuojant galima perkelti į +4°C.

2.2.2 PGR reakcijų sąlygos

I ir II klasių integronų variabiliosios srities DNR, *intI1* ir *intI2* genai, *sull* genetinė determinantė, *A. baumannii* ECI-III klonams būdingi genai padauginėti įprastos polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu, naudojant 2.4 lentelėje pateiktus oligonukleotidinius pradmenis.

Įprasta PGR buvo vykdoma automatiniame termocikleryje „DNA Engine Dyad“ (BIO-RAD, JAV) arba „TPersonal“ (Biometra, Vokietija) pagal DNR polimerazių gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinį (25 µl) sudaro: 10x Taq DNR polimerazės reakcijos buferis, dNTP mišinio (0,2 mM kiekvieno), 2,5 mM MgCl₂, 2 µl bakterijų lizato kaip DNR matricos (paruošto kaip aprašyta 2.2.1 skyriuje), tiesioginis ir galinis oligonukleotidiniai pradmenys (0,4 µM kiekvieno), 0,5 a.v. Taq DNR polimerazės. Reakcijos mišinys supurtomas ir trumpai centrifuguojamas mikrocentrifugoje. PGR reakcijų detalios sąlygos pateiktos 2.5 lentelėje.

PGR produktai analizuojami frakcionuojant juos 0,7 – 2,0 % agarozės gelyje, kaip aprašyta žemiau (žr. 2.2.3 sk.).

Didelių (>3 kb) DNR fragmentų padauginimui naudojamas automatinis termocikleris „DNA Engine Dyad“ (BIO-RAD, JAV), o reakcijos mišinys ruošiamas naudojant komercinio rinkinio „Long PCR Enzyme Mix“ (Thermo Scientific, Lietuva) reagentus. Reakcijos mišinį (50 µl) sudaro: 10X Long PCR polimerazių mišinio buferis su 15 mM MgCl₂, dNTP mišinys (0,2 mM kiekvieno), tiesioginio ir galinio oligonukleotidio pradmens (0,5 µM kiekvieno), 0,1 µg išgrynintos DNR matricos, 1,5 a.v. „Long PCR Enzyme Mix“ polimerazių mišinio. Pageidautinas reakcijoje naudojamų pradmenų ilgis 25 – 32 nt. Reakcijos mišinys supurtomas ir trumpai centrifuguojamas mikrocentrifugoje. PGR reakcijų detalios sąlygos pateiktos 2.5 lentelėje.

PGR produktai taip pat analizuojami frakcionuojant juos 0,7 % agarozės gelyje.

Lentelė 2.5 PGR reakcijų sąlygos.

Etapas	<u>Standartinė PGR</u>			<u>Ilgų DNR fragmentų PGR</u>		
	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
<i>Pradinė denatūracija</i>	94 °C	5 min	1	94 °C	3 min	1
<i>Denatūracija</i>	94 °C	30 s	25–30	95 °C	20 s	10
<i>Pradmenų prilipinimas</i>	$T_m - 3\text{ °C}^*$	30 s		$T_m - 3\text{ °C}^*$	30 s	
<i>Sintezė</i>	72 °C	1 min/kb		68 °C	50 s/kb	
<i>Denatūracija</i>	–	–	–	95 °C	20 s	25
<i>Pradmenų prilipinimas</i>	–	–	–	$T_m - 3\text{ °C}^*$	30 s	
<i>Sintezė</i>	–	–	–	68 °C	45–60 s/kb+2 s/ciklą	
<i>Galutinė sintezė</i>	72 °C	7 min	1	68 °C	10 min	1

* T_m – pradmenų lydymosi temperatūra.

2.2.3 DNR fragmentų frakcionavimas agarozės gelyje

DNR fragmentai frakcionuojami elektroforezės būdu 0,7 – 2 % agarozės gelyje (Sambrook ir kt., 1989). Gelio sudėtis: 1 – 2 g agarozės 100 ml TAE buferio (40 mM TRIS-acetatas, 2 mM EDTA, 0,5 µg/ml etidžio bromido, pH 8,0). Elektrodinis buferis: 40 mM TRIS-acetatas, 2 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 µg/ml etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma naudojant 5 V/cm srovę elektroforezės aparate „Sub-Cell GT“ (BIO-RAD, JAV). DNR stebima apšviečiant gelį 302 nm bangos ilgio ultravioletiniais spinduliais transiliumatoriuje „Gel Doc XR+“ (BIO-RAD, JAV).

2.2.4 PGR produktų deproteinizacija, išsodinimas, valymas ir sekoskaita

Po PGR reakcijos mišiniai deproteinizuojami: pripilama 0,5 tūrio fenolio (skirtas DNR skyrimui) ir 0,5 tūrio chloroformo (abu laikomi +4 °C), gerai supurtoma ir centrifuguojama mikrocentrifugoje 10 min 12000 g. Tirpalas nusistovi į dvi fazes: viršutinę vandeninę ir apatinę organinę. Viršutinis vandeninis sluoksnis kruopščiai surenkamas neužgriebiant organinės fazės į švarų mėgintuvėlį. Į surinktą vandeninį sluoksnį pripilama 1/10 tūrio CH₃COONa ir du tūriai atšaldyto (–20°C) 96 % etanolio. Tirpalas sumaišomas

ir paliekamas 2 val. (arba per naktį) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Centrifuguojama 10–15 min 12000 g. Nuosėdos išdžiovinamos palikus atvirą mėgintuvėlį kambario temperatūroje po staline lempa (~1 val.) ir ištirpinamos minimaliame (~20 μl) TE buferio (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) arba sterilaus dejonizuoto H_2O tūryje (Sambrook ir kt., 1989).

DNR fragmentai gryninami iš agarozinio gelio naudojant komercinius rinkinius „Perfectprep Gel Cleanup Kit“ (Eppendorf, Vokietija) ir „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific, Lietuva).

Išgrynintų DNR fragmentų koncentracija nustatoma elektroforezės agarozės gelyje būdu arba spektrofotometru „NanoDrop 2000“ (Thermo Scientific, JAV). Fragmentų DNR sekos nuskaitytos VU Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre. Mėginiai sekoskaitai pateikti pagal sekvenavimo centro reikalavimus.

2.2.5 Chromosominės DNR išskyrimas

Ląstelės auginamos 2 ml LB terpės iki stacionarios augimo fazės. 0,5 ml bakterijų kultūros centrifuguojama mikrocentrifugoje 5 min 5000 g. Ląstelės suspenduojamos 200 μl GTEL buferio (50 mM TRIS-HCl, 50 mM gliukozės, 50 mM EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lizocimo, pH 8,0), inkubuojamos 5 min kambario temperatūroje. Pripilama 500 μl TESK buferio (50 mM TRIS-HCl, 50 mM EDTA, 1% NDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinazės K, pH 8,0). Tirpalas inkubuojamas 2 val. $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Pridedama ribonukleazės A (galutinė koncentracija 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ir dar 30 min inkubuojama $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrahuojama vienodu tūriu fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio (25:24:1) mišiniu tris kartus (stipriai nepurtyti). Į vandeninę fazę, atskirtą po ekstrakcijos, pripilama 1/10 tūrio 3M CH_3COONa . Iš tirpalo DNR išsodinama 2 tūriais etanolio, atšaldyto $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Susidariusios nuosėdos plaunamos 70 % etanolio tirpalu ir ištirpinamos steriliame dejonizuotame H_2O . Chromosominė DNR analizuojama 0,7 % agaroziniame gelyje kaip aprašyta aukščiau (žr. 2.2.3 sk.).

Chromosominė DNR taip pat buvo išskiriama naudojant automatizuotą sistemą Arrow™ (NorDiag, Norvegija), vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.6 Plazmidinės DNR išskyrimas

Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje 100 ml LB terpėje 14–16 val. iki stacionarios augimo fazės. Kolba su bakterijomis 20 min laikoma ledu vonelėje ir centrifuguojama 10 min 7000 g 4 °C temperatūroje. Ląstelės suspenduojamos 50 ml STE buferio (10 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Centrifuguojama 10 min 7000 g 4 °C temperatūroje. Toliau ląstelės suspenduojamos 5 ml TEL buferio (25 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 2 mg/ml lizocimo, pH 8,0) ir inkubuojama 10 min kambario temperatūroje. Maišant staigiai įpilama 10 ml lizės tirpalo (0,2 M NaOH, 1 % NDS) ir inkubuojama leduose 10 min. Greitai įpilama ir išmaišoma 7,5 ml šalto 5 M kalio acetato (pH 5,5). Inkubuojama 10 min leduose ir po to 20 min centrifuguojama 10000 g 4 °C temperatūroje. Į supernatantą įpilama 0,6 tūrio izopropanolio ir inkubuojama kambario temperatūroje 2 val. Po to centrifuguojama 20 min 10000 g kambario temperatūroje, susidariusios nuosėdos išdžiovinamos ir suspenduojamos 0,5–1 ml dejonizuoto vandens. Pripilamas lygus tūris 9 M LiCl tirpalo. Inkubuojama 30 min 20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 5 min 10000 g kambario temperatūroje. DNR iš supernatanto išsodinama dviem tūriais šalto etanolio. Laikoma per naktį –20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 10 min 10000 g, susidariusios nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos minimaliame sterilaus dejonizuoto vandens kiekyje. Plazmidės DNR analizuojama 0,7–1,0 % agarozės gelyje kaip aprašyta aukščiau (žr. 2.2.3 sk.).

Plazmidės DNR skyrimui taip pat naudoti komerciniai rinkiniai „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific, Lietuva), „NucleoSpin Plasmid“ ir „NucleoBond BAC100“ (abu Macherey-Nagel, Vokietija).

2.2.7 Pulsuojančio elektrinio lauko gelio elektroforezė (PFGE)

2.2.7.1 Mėginių paruošimas

Ląstelės auginamos skystoje LB terpėje 14 – 16 val. iki stacionarios augimo fazės. Centrifuguojama 10 min 4 °C temperatūroje 5000 g. Ląstelės suspenduojamos 2 ml TE buferio (100 mM TRIS-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0). Pasiekama ląstelių suspensijos koncentracija, lygi 1,35 optinio tankio vienetų (610 nm bangos ilgis). 0,4 ml ląstelių suspensijos pernešama į 1,5 ml mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, įpilama 20 µl proteinazės K tirpalo (20 mg/ml) ir švelniai išmaišoma. Į ląstelių suspensiją įpilama 400 µl išlydytos 55–60 °C temperatūros 1 % „Certified Megabase“ (BIO-RAD, JAV) agarozės (1 % NDS), švelniai išmaišoma ir reikiamas mišinio kiekis nedelsiant perkeliamas į sterilią lydymo formelę. Formelė 10 – 15 min laikoma kambario temperatūroje, vėliau 5 min 4 °C temperatūroje, leidžiant sustingti agarozės/bakterijų kubeliams. Sustingę kubeliai steriliu įrankiu išstumiami į 5 ml lizės buferio (50 mM TRIS-HCl, 50 mM EDTA, 1 % sarkozilio, 0,1 mg/ml proteinazės K, pH 8,0). Kubeliai lizės buferyje inkubuojami 54 °C temperatūroje nuolat purtant (150–175 rpm) iki 16 val. purtyklėje (Eppendorf, Vokietija). Po lizės kubeliai plaunami 2 kartus steriliame 50 °C temperatūros vandenyje purtant po 10 – 15 min, tada plaunami 4 kartus steriliame 50 °C temperatūros TE (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) buferiniame tirpale purtant po 10 – 15 min.

Genotipavimo tyrimams mėginiai ruošiami šiuo būdu: steriliu įrankiu atpjovus 2–2,5 mm pločio agarozės kubelio juostelę, ji toliau naudojama DNR restrikcijai endonukleaze *ApaI* (*A. baumannii* bakterijoms). Agarozės juostelė inkubuojama 5–10 min 37 °C 200 µl 1x restrikcijos buferyje (Thermo Scientific, Lietuva), vėliau pernešama į 200 µl restrikcijos mišinį (30 a.v. *ApaI* restrikcijos endonukleazės) ir inkubuojama 6 val. 37 °C temperatūroje. Hidrolizuoti ir nehidrolizuoti mėginiai saugomi 4 °C temperatūroje TE buferiniame tirpale.

Plazmidžių dydžių analizei mėginiai paruošiami šiuo būdu: 2–2,5 mm pločio agarozės kubelio juostelė veikiama nukleaze *S1* 200 µl restrikcijos

mišinyje (5 a.v. nukleazės *S1*) 4 val. 37 °C temperatūroje. Vėliau mėginiai saugomi 4 °C temperatūroje TE buferiniame tirpale.

2.2.7.2 Elektroforezė

Pulsuojančio elektrinio lauko gelio elektroforezė (PFGE) vykdoma 1,0 % „Certified Megabase“ (BIO-RAD, JAV) agarozės gelyje. Gelio sudėtis: 1 g agarozės 100 ml 0,5x TBE buferio (45 mM TRIS-HCl, 45 mM boro rūgšties, 1 mM EDTA, pH 8,0). Elektrodinis buferis: 45 mM TRIS-HCl, 45 mM boro rūgšties, 1 mM EDTA, pH 8,0. Agarozės kubeliai su *ApaI* ar *S1* fermentais veikta ir neveikta DNR (žr. sk. 2.2.7.1) steriliais įrankiais patalpinami į gelio tuščius šulinėlius, ant viršaus užliejama ir sustingdoma skysta agarozė. *ApaI* veiktų mėginių elektroforezė vykdoma naudojant 6 V/cm srovę elektroforezės aparate „CHEF Mapper® XA“ (BIO-RAD, JAV), naudojant parametrus: pradinis pulso laikas 5 s, galutinis pulso laikas 30 s, trukmė 20 val., buferio temperatūra 14 °C. *S1* nukleaze veiktų mėginių elektroforezės parametrai: pradinis pulso laikas 0,06 s, galutinis pulso laikas 21,8 s, trukmė 13 val., buferio temperatūra 14 °C. Po elektroforezės gelis inkubuojamas etidžio bromido tirpale (1 µg/ml) 30 min., plaunamas steriliu dejonizuotu vandeniu 3 kartus. DNR stebima apšviečiant gelį 302 nm bangos ilgio ultravioletiniais spinduliais transiliumatoriuje „Gel Doc XR+“ (BIO-RAD, JAV).

2.2.8 DNR hibridizacinė analizė

2.2.8.1 DNR žymėjimas radioaktyviuoju [α -³²P]-dATP arba biotin-11-dUTP

Integronų genetinės lokalizacijos tyrimuose, 331 bp *sull* geno ir 559 bp *aadA1* geno fragmentai žymėti radioaktyviuoju [α -³²P]-dATP (Hartmann Analytics, Vokietija). Žymėjimui naudotas komercinis rinkinys „DecaLabel DNA Labeling Kit“ (Thermo Scientific, Lietuva), remiantis gamintojo rekomendacijomis. Žymėta DNR laikoma –20 °C temperatūroje.

pAB120 plazmidės genetiniam kartiravimui (angl. *mapping*), 825 bp dydžio *bla*_{OXA-24/40} fragmentas žymėtas biotin-11-dUTP, naudojant komercinį

rinkinį „Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit“ (Thermo Scientific, Lietuva) pagal gamintojo rekomendacijas. Žymėta DNR saugoma –20 °C temperatūroje.

2.2.8.2 Gelio ir membranos paruošimas

Išfrakcionavus DNR fragmentus agarozės gelyje, jis nufotografuojamas ir paruošiamas fragmentų pernešimui ant nailoninės membranos „Hybond N“ (Amersham Pharmacia Biotech, D. Britanija). Gelis užpilamas keliais tūriais 1,5 M NaCl, 0,5 M HCl tirpalo ir 45 min inkubuojamas kambario temperatūroje švelniai purtant. Po inkubacijos gelis praplaunamas steriliu dejonizuotu vandeniu ir neutralizuojamas užpylus kelis tūrius 1 M TRIS-HCl, 1,5 M NaCl (pH 7,4) tirpalo. Švelniai purtoma 30 min. Neutralizacijos tirpalas pakeičiamas nauju ir dar plaunama 15 min. Membrana iškerpama taip, kad ji būtų 1 mm platesnė, nei gelis. Ji pamerkiama į dejonizuotą vandenį, po to į pernešimo buferį 10x SSC (1 l 20x SSC: 175,3 g NaCl, 88,2 g natrio citrato, pH 7,0).

2.2.8.3 DNR pernešimas

Ant vonelės, kurioje yra 10x SSC pernešimo buferinis tirpalas, kraštu uždedamas stiklas. Ant jo – filtrinio popieriaus Whatman 3 MM juosta, kurios kraštai panardinami į pernešimo buferį. Kai juosta sudrėksta, ant jos uždedamas gelis, membrana, po to du gelio dydžio 3 MM Whatman lapai ir 5–8 cm filtrinio popieriaus sluoksnis. Ant jo uždedamas 0,5 kg svoris. Paliekama 24 val. Filtrinis popierius nuimamas, o membrana plaunama 5 min 6x SSC tirpale kambario temperatūroje ir išdžiovinama. DNR ant membranos fiksuojama kaitinimo krosnyje 2 val. 70 °C arba 5 min UV.

2.2.8.4 Hibridizacija

Fiksuota membrana sudrėkinama 6x SSC ir įdedama į hibridizacijos mėgintuvėlį. Supilama 10 ml prehibridizacijos tirpalo: 6 ml 20x SSC, 1 ml Denhardto reagento, 1 ml 10 % NDS, 10 ml formamido, 400 µl lašišos spermos DNR (prieš ruošiant prehibridizacijos tirpalą, ši DNR 5 min

pakaitinama 100 °C temperatūroje ir staigiai atšaldoma leduose) ir 1,6 ml H₂O. Prehibridizuojama 43 °C temperatūroje hibridizacijos krosnyje (Amersham, D. Britanija) sukant bent 4 val. Pasibaigus prehibridizacijai įdedama apie 50 μl radioaktyvaus arba biotinu žymėto zondo (jis denatūruojamas 5 min 95 °C, staigiai atšaldomas leduose, susidarę kondensato lašeliai nucentrifuguojami mikrocentrifugoje). Hibridizuojama hibridizacijos krosnyje per naktį. Po hibridizacijos membrana plaunama: du kartus 2x SSC/0,1 % NDS po 100 ml 10 min kambario temperatūroje sukant krosnelėje, du kartus 0.2x SSC/0,1 % NDS po 100 ml 10 min kambario temperatūroje sukant krosnelėje. Po plovimo membrana ištraukiama, nusausinama, padedama ant kieto švaraus paviršiaus. Jei buvo hibridizuota su radioaktyviaja žyme žymėtu zonu, membrana užvyniojama švaria plėvele. Dedama į šviesią kasetę ir atliekama autoradiografija. Inkubuojama apie 6 val. Gautas signalas detektuojamas fosfovaizdžiu „FLA-5100“ (FujiFilm, JAV).

Jei buvo hibridizuojama su biotinu žymėtu zonu, po hibridizacijos ir plovimo, membrana inkubuojama 55 °C temperatūroje sukant krosnelėje su 5 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4): 0,1 % Tween: 1 % pieno tirpalu. Tada membrana inkubuojama 30 min kambario temperatūroje sukant krosnelėje su 5 ml PBS:0,1 % Tween:1 % pieno tirpalo, pridėjus 2 μl streptavidino-HRP (angl. *Streptavidin-Horseradish peroxidase*) (RD Systems, JAV). Membrana plaunama 3 kartus po 15 ml PBS:0,1 % Tween tirpalo po 15 min kambario temperatūroje, taip pat 2 kartus po 15 ml dejonizuotu vandeniu kambario temperatūroje. Po plovimo membrana nusausinama, veikiama chemiliuminescenciniais reagentais ECL (Amersham Pharmacia Biotech, D. Britanija) ir eksponuojama švarioje kasetėje nuo kelių valandų iki kelių parų.

Po hibridizacijos biotinu žymėtu zonu, detekcija taip pat buvo atliekama ir naudojant komercinį rinkinį „Biotin Chromogenic Detection Kit“ (Thermo Scientific, Lietuva), vadovaujantis gamintojo pateikiamomis rekomendacijomis.

2.2.9 Imliųjų ląstelių paruošimas ir temperatūrinė transformacija

Į 50 ml terpės (LB terpė, 10 mM MgSO₄, 0,2 % gliukozės, pH 7,4) inokuliuojama 0,5 ml naktinės ląstelių kultūros, užaugintos šioje terpėje. Auginama 37 °C temperatūroje iki optinio tankio A₅₉₀=0,3. Bakterijų kultūra 10 min laikoma leduose. Centrifuguojama 3000 g 10 min 4 °C temperatūroje. Ląstelės suspenduojamos 0,5 ml atšaldytos auginimui naudotos terpės ir 2,5 ml LB terpės (su 36 % glicerolio, 12 % PEG, 12 mM MgSO₄). Ląstelių tirpalas išpilstomas į mikrocentrifuginius mėgintuvėlius po 0,2 ml ir užšaldomas –80 °C temperatūroje.

Atliekant terminę transformaciją, į 0,2 ml imliųjų *E. coli* ląstelių kultūrą pripilama 5–10 μl transformuojančios DNR ir inkubuojama 30 min leduose. Mėginys 1 min pernešamas į 42 °C vandens vonią, o po to 2 min grąžinamas į ledo vonią. Tirpalas praskiedžiamas pašildyta (37 °C) LB terpe iki 1,5 ml ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje 1–2 val. Ląstelės centrifuguojamos 5 min 5000 g, resuspenduojamos 100 μl terpės ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su reikiamu antibiotiku. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 14–16 val.

2.2.10 Elektro-imliųjų ląstelių paruošimas ir elektroporacija

Bakterijų kolonija inokuliuojama į 5 ml LB terpės ir auginama 14–16 val 37 °C temperatūroje. 2,5 ml naktinės kultūros perkeliama į 500 ml šviežios LB terpės. Auginama 37 °C temperatūroje iki optinio tankio A₅₉₀=0,5–0,7. Ląstelių kultūra 10–15 min laikoma leduose. Tolesnės procedūros atliekamos laikant ląsteles 2 °C temperatūroje. Ląstelės centrifuguojamos 5500 g 20 min. Terpė nupilama, o bakterijos suspenduojamos 5 ml atšaldyto sterilaus distiliuoto vandens. Pripilama dar 500 ml sterilaus šalto vandens ir centrifuguojama 5500 g 20 min. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos minimaliame vandens tūryje. Galutinė ląstelių suspensija išpilstoma po 100 μl į atšaldytus mikrocentrifuginius mėgintuvėlius ir užšaldoma –80 °C temperatūroje.

Elektrotransformacija (elektroporacija) atliekama elektroporatoriumi „Electroporator 2510“ (Eppendorf, Vokietija). Elektroporacijos parametrai – lauko įtampa 2500 V, pulso trukmė 5 ms. Į 100 µl kompetentinių ląstelių suspensijos įpilama 6–10 µl transformuojančios DNR ir išmaišoma. Mišinys supilamas į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę, kuri nedelsiant įstatoma į prietaiso kiuvečių laikiklį ir veikiama elektros impulsu. Iš karto po elektrotransformacijos kiuvetė ištraukiama ir transformacijos mišinys pernešamas į 1 ml LB terpės. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 2–3 val. Po inkubacijos po 100 µl ląstelių kultūros išsėjama ant agarizuotos LB terpės su atitinkamu antibiotiku. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 14–16 val.

2.2.11 Bakterijų konjugacija

Bakterijų konjugacijos eksperimentai atliekami poruojant *E. coli* arba *S. enterica* padermes (donorai), turinčias atitinkamą integronų tipą, su rifampicinui atsparia recipientine *E. coli* HK225 paderme santykiu 1:5 kaip aprašyta Kadlec ir Schwarz (2008). Transkonjugantai atrenkami ant agarizuotos LB terpės su rifampicinu ir atitinkamu kitu antibiotiku (spektinomycinu arba trimetoprimu). Integronų pernaša patvirtinama PGR būdu, padauginant *intI1*, *intI2*, *sulI* genų fragmentus ir kintamąsias integronų sritis.

2.2.12 Restrikinė analizė

I ir II klasės integronų kintamųjų sričių restrikinė analizė vykdyta naudojant restrikcijos endonukleazes *AluI*, *Bsp143I* ir *HinI*. *A. baumannii* plazmidžių genetinės struktūros analizei naudotos restrikcijos endonukleazės *EcoRI*, *EcoRV*, *Eco47I*, *Eco57I*, *Eco88I*, *BstXI*, *BsrDI*, *DraIII*, *HindIII*, *PaeI*, *PstI*, *XbaI*, *SalI*, *XhoI*.

Į bendrą restrikcijos mišinį (20 µl) pripilta: 15 µl PGR reakcijos produktų mišinio, 2 µl 10x restrikcijos buferio, 5 a.v. atitinkamos restrikcijos endonukleazės, sterilaus dejonizuoto vandens. Reakcijos mišinys inkubuojamas ~ 2 val. 37 °C temperatūroje. Restrikcijos produktai

analizuojami frakcionuojant 1–2 % agarozės gelyje kaip aprašyta aukščiau (žr. 2.2.3 sk.).

2.2.13 *A. baumannii* ST tipų nustatymas

A. baumannii bakterijų padermių ST (angl. *Sequence Type*) tipų nustatymui pasirinkta Pasteur instituto siūloma MLST (angl. *multi-locus sequence typing*) schema (www.pasteur.fr/mlst). Standartinės PGR būdu padauginti *A. baumannii* genų *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB* fragmentai, nustatytos jų nukleotidų sekos ir pagal šių genų alelių derinius identifikuoti ST tipai. Naudoti oligonukleotidiniai pradmenys pateikti lentelėje 2.4, o PGR sąlygos nurodytos www.pasteur.fr/mlst.

2.2.14 Minimalios slopinančios koncentracijos nustatymas

A. baumannii bakterijų – pAB120 plazmidę turinčios donorinės padermės, recipientinės padermės ir transformantų – minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) imipenemui ir meropenemui nustatymas atliekamas agaro skiedimo metodu Mueller-Hinton agarizuotoje terpėje (Oxoid, D. Britanija), vadovaujantis CLSI rekomendacijomis (CLSI, 2009).

2.2.15 Duomenų vaizdinimas ir bioinformatinė tyrimų rezultatų analizė

Duomenų vaizdinimui, apdorojimui ir analizei naudotos kompiuterinės programos: elektroforezės gelių analizės programa „Image Lab“ (BIO-RAD, JAV), sekų palyginio sudarymo programa „ClustalW“ (Thompson ir kt., 1994), sekoskaitos rezultatų peržiūros programa „ChromasPro Version 1.22“ (Technelysium Pty Ltd, Australija), pradmenų parinkimo programa „Primer3“ (Rozen ir Skaletsky, 2000), hibridizacijos fosfovaizdžio programa „Multi Gauge V3.1“ (FujiFilm, JAV), homologinių DNR sekų paieškos programa „n-BLAST“, DNR sekų analizės programa „Workbench“ (CLC Bio, Danija), PFGE gelių ir genotipavimo profilių analizės programa „Gel Compar II“ (Applied Maths, JAV).

Lyginant integronų tipų, atsparumo genų, plazmidžių replikonų tipų, vyraujančių klonų paplitimą skirtingose padermių grupėse, taikytas χ^2 arba Fisher testas. P reikšmei esant $<0,05$, buvo laikoma, kad skirtumas yra statistiškai reikšmingas. Statistinė analizė atlikta kompiuterine programa GraphPad Prism (GraphPad, JAV).

3. REZULTATAI

3.1 Integronų paplitimas ir genetinė struktūra antibiotikams atspariose Gram neigiamose bakterijose

Nesudėtinga integronų struktūra yra veiksminga genetinė platforma kasečių, esančių bakterijų aplinkoje ir dažnai turinčių atsparumą antibiotikams lemiančių genų, mobilizavimui. Integronai užtikrina jų raišką, taip pasireiškia atsparumas įvairiems antibiotikams („Literatūros apžvalga“, skyrius 1.3.3). Pasaulyje atliekama nemažai tyrimų, leidžiančių įvertinti integronų paplitimą, juose esančių genų kasečių kombinacijų dažnį ir įvairovę tarp patogeniškų Gram neigiamų bakterijų („Literatūros apžvalga“, skyrius 1.3.3.6). Šie duomenys svarbūs siekiant suprasti atsparumo genų paplitimo mastą ir jų pernašos kelius, nes tam tikri integronų genų kasečių deriniai yra epidemiologiškai išplitę visame pasaulyje, kiti – tik atskirose šalyse ar regionuose. Iki šiol nebuvo žinoma apie su DAA fenotipu susijusių integronų paplitimą Lietuvos klinikinėje ir veterinarinėje aplinkoje. Šiame darbe pateikiami rezultatai leidžia ne tik daryti apibendrinančias išvadas apie integronų epidemiologiją mūsų šalyje, bet taip pat įvertinti bakterijų dauginio atsparumo antibiotikams mastą Lietuvoje.

3.1.1 I ir II klasės integronai *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Acinetobacter baumannii*

E. coli ir *S. enterica*. I ir II klasės integronus, taip pat genus *intI1* ir *intI2* turinčių *E. coli* ir *S. enterica* padermių, išskirtų iš klinikinės ir gyvūninės kilmės šaltinių, paplitimo dažniai parodyti 3.1 A ir B paveiksluose.

Integronus turėjo 37 % (113/304) klinikinės ir gyvūninės kilmės *E. coli* ir *S. enterica* padermių, atsparių bent dviems skirtingiems antibiotikams. I ir II klasės integronų paplitimo dažnis atitinkamai siekė 32 % (98/304) ir 6 % (19/304). Dvi *S. enterica* padermės turėjo po du skirtingus I klasės integronus, o keturios *E. coli* padermės – abiejų klasių integronus.

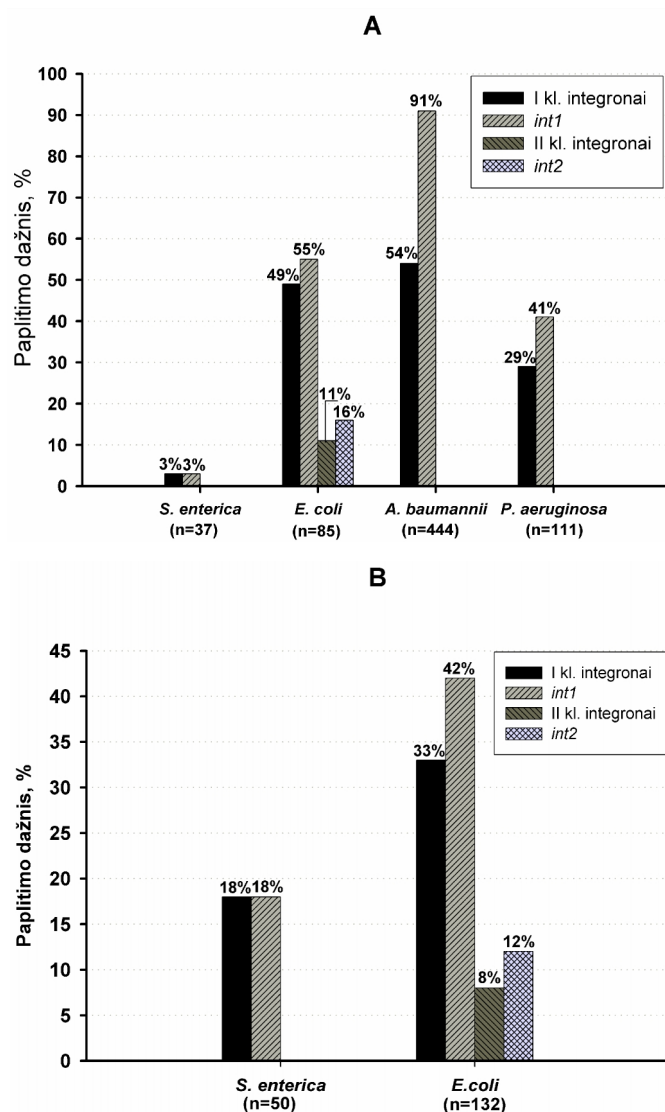
I ir II klasės integrazes koduojantys genai *intI1* ir *intI2*, būdingi 5'-KS sritims, nustatyti 38 % (114/304) ir 10 % (30/304) enterobakterijų padermių. 14 % (16/114) I klasės integrazes ir 37 % (11/30) II klasės integrazes koduojančių padermių kintamosios dalies su atsparumą antibiotikams suteikiančiomis genų kasetėmis neturėjo. Be to, 8 % (9/114) I klasės integrazes turinčių padermių neturėjo integronų 3'-KS sritims būdingo atsparumą sulfonamidams suteikiančio geno *sulI*, koduojančio dihidropteorato sintazę.

Integronus turėjo 47 % (103/217) *E. coli* padermių. I klasės integronai nustatyti 41 % (88/217), II klasės integronai – 9 % (19/217) padermių. Atsižvelgiant į didžiausias *E. coli* padermių grupes pagal jų išskyrimo šaltinį, I ir II klasės integronus turėjo atitinkamai 53 % (31/59) ir 14 % (8/59) padermių, išskirtų iš šlapimo takų infekcijomis sergančių pacientų klinikinės medžiagos, 58 % (25/43) ir 7 % (3/43) padermių, išskirtų iš galvijų, 26 % (9/35) ir 14 % (5/35) padermių, išskirtų iš kiaulių, 22 % (12/54) ir 4 % (2/54) padermių, išskirtų iš naminių paukščių mėginių. Taigi, iš klinikinių šaltinių išskirtose *E. coli* I ir II klasės integronų dažnis atitinkamai siekė 49 % (42/85) ir 11 % (9/85) (3.1 pav., A), tuo tarpu iš gyvūnų išskirtose padermėse jis buvo kiek mažesnis – 33 % (43/132) ir 8 % (10/132) (atitinkamai, $p=0,01313$ ir $p=0,4435$) (3.1 pav., B).

S. enterica bakterijos turėjo tik I klasės integronus. Jie rasti 11 % (10/87) tirtų padermių. Iš visų 37 klinikinės kilmės *S. enterica* padermių, I klasės integronas nustatytas tik vienoje (3 %, 1/37, 3.1 pav., A), tuo tarpu integronų paplitimo dažnis tarp *S. enterica* padermių, išskirtų iš kiaulienos ir paukštienos mėginių, siekė 18 % (9/50, 3.1 pav., B)

P. aeruginosa, išskirtose iš Lietuvos ligoninėse gydytų pacientų klinikinės medžiagos, I klasės integrazės genas nustatytas 41 % (46/111) padermių. Kintamąją integrono dalį turėjo 29 % (32/111) padermių (3.1 pav., A). Dauguma integronų su kintamąja dalimi (56 %, 18/32) rasti padermėse, išskirtose iš kvėpavimo takų (bronchų ir trachėjos sekreto bei nuoplovų), kitą dalį (14/32, 44 %) sudarė integronai, rasti padermėse iš kitų šaltinių (šlapimo, kraujo ir kitų mėginių).

A. baumannii. Net 91 % (406/444) tirtų klinikinės kilmės *A. baumannii* padermių turėjo I klasės integrązę koduojantį geną *intI1* (3.1 pav., A). Geno paplitimo dažnis buvo panašus (96 %) tarp karbapenemams jautrių *Klasterio 1* (ECI klonas) ir karbapenemams atsparių *Klasterio 2* (ECII klonas) padermių (detaliau apie *A. baumannii* genotipavimą ir *Klasteriams 1–2* priskiriamas bakterijų padermes – žr. skyrių 3.2.1). Kintamąją I klasės integrono dalį turėjo 54 % (238/444) *A. baumannii* padermių (3.1 pav., A). 168/406 padermės su genu *intI1* (41 %) genų kasečių neturėjo. II klasės integronų integrązės *intI2* genai *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* bakterijose nenustatyti.



3.1 pav. I ir II klasės integronų, integrązių genų *intI1* ir *intI2* paplitimas *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* padermėse, išskirtose iš klinikinės (A) ir gyvūninės (B) kilmės mėginių.

3.1.2 I ir II klasės integronų genų kasetės, lemiančios atsparumą antibiotikams

Integronų genų kasetes ir jų derinius nustatėme daugindami integronų VS dalies DNR PGR metodu su oligonukleotidiniais pradmenimis, komplementariais konservatyviems 5'-KS ir 3'-KS galų DNR fragmentams. Susintetinti amplikonai analizuoti restrikcijos endonuklazėmis ir sekoskaita (žr. „Medžiagos ir metodai“).

I ir II klasės integronuose iš viso nustatyta 31 skirtinga genų kasetė, iš jų 25 kodavo atsparumą antibiotikams lemiančius baltymus (Lentelė 3.1).

Klinikinės ir gyvūninės kilmės *E. coli* ir *S. enterica* integronuose vyravo genai, koduojantys aminoglikozidų adeniltransferazes (*aad* šeima) ir dihidrofolato reduktazes (*dfr* šeima), lemiantys atsparumą streptomycinui/spektinomycinui bei trimetoprimui (3.2 pav., A ir B). Klinikinės kilmės enterobakterijų integronuose radome po keturis variantus genų, koduojančių aminoglikozidų adeniltransferazes (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadB*) ir dihidrofolato reduktazes (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA17*). Pirmojoje grupėje vyravo *aadA5* (27/55) ir *aadA1* (23/55) genai, antrojoje – *dfrA17* (27/49) ir *dfrA1* (19/49) genai (3.2 pav., A).

sat1 kasetes, lemiančias atsparumą streptotricinui, nustatėme tik II klasės integronuose. Gana reti buvo genai *cmlA* (koduoja chloramfenikolio nešiklį), *ereA2* (koduoja eritromicino esterazę), *bla_{OXA-1/30}* (koduoja β-laktamazę); taip pat genai, koduojantys nežinomos funkcijos atvirusius skaitymo rėmelius *orfF* (3.2 pav., A).

Vienoje klinikinės kilmės *S. enterica* padermėje nustatėme du I klasės integronus, turinčius po *aadA2* ar *bla_{PSE-1}* (koduoja β-laktamazę) kasetę (3.2 pav., A).

Gyvūninės kilmės *E. coli* ir *S. enterica* bakterijų integronuose *aad* ir *dfr* genų šeimose vyravo *aadA1* (79 %, 50/63) ir *dfrA1* (77,5 %, 31/40) genų variantai (3.2 pav., B). Trijų *E. coli* padermių integronai turėjo *dfrA14* ir *aadA6* genus, o trijų *S. enterica* padermių – *aadA7* geną. Papildomi tyrimai parodė, kad *dfrA14* genai klinikinės kilmės *E. coli* gali būti įterpti defektyviuose I ir II klasės integronuose, kurie neturėjo 3'-KS dalies (Šeputienė ir kt., 2010c;

duomenys neparodyti). Tarp klinikinės kilmės bakterijų integronų itin paplitę *dfrA17* ir *aadA5* genai buvo aptikti tik dviejose gyvūninės kilmės padermėse. Tuo tarpu tik gyvūninės kilmės *E. coli* (aštuoniose padermėse) ir *S. enterica* (vienoje padermėje) I ir II klasės integronai turėjo geną *estX*, koduojantį nežinomos funkcijos esterazę. Analogiškai klinikinės kilmės *S. enterica* atvejui, vienoje *S. enterica* padermėje (išskirtoje iš vištienos mėginio), buvo nustatyti du I klasės integronai, turintys tas pačias kasetes *aadA2* ir *bla_{PSE-1}* (3.2 pav., B).

Kitaip integronai buvo pasiskirstę klinikinės kilmės *P. aeruginosa* ir *A. baumannii*. Juose taip pat vyravo atsparumą aminoglikozidams lemiantys genai, tačiau visiškai nebuvo atsparumo trimetoprimui genų (Lentelė 3.1 ir 3.2 pav., C ir D). Klinikinės kilmės *P. aeruginosa* integronuose nustatėme 47 kasetes, iš jų – 17 *aacA* šeimos (16 *aacA4* ir 1 *aacA7*) genų, koduojančių acetiltransferazes, ir lemiančias atsparumą amikacinui ir tobramicinui, taip pat po aštuonias kasetes *aadB* (suteikia atsparumą gentamicinui, kanamicinui, tobramicinui) ir *aadA6*, kurios, beje, buvo aptiktos ir enterobakterijų integronuose (3.2 pav., B). Dalies *P. aeruginosa* padermių I klasės integronai turėjo nežinomos funkcijos *gcuD* geną.

Trys integronai turėjo *bla_{OXA-1/30}* geną, koduojantį siauro spektro β-laktamazę, vienas – *bla_{OXA-205}* geną, koduojantį OXA-2 pošeimės β-laktamazę. Šios pošeimės β-laktamazės hidrolizuoja aminopenicilinus (pvz., ampiciliną, amoksiciliną) ir ureidopenicilinus (pvz., piperaciliną, mezlociliną).

Viena *P. aeruginosa* padermė, išskirta iš kvėpavimo takų, turėjo integroną su *smr2* genu, koduojančiu SMR šeimos baltymą (angl. *small multidrug resistance protein*). Žinoma, kad šios šeimos baltymai iš bakterijų šalina ketvirtinius amonio junginius, etidžio bromidą, tetracikliną, tetrafenilfosfonio jonus bei kitas bakterijoms toksiškas katijonines medžiagas (Schuldiner ir kt., 2001).

27 % (238/893) *A. baumannii* integronuose nustatytų genų kasečių priklausė aminoglikozidų acetiltransferazes koduojančių genų šeimoms (*aacC1* ir *aacA4*), 24 % (213/893) – *aad* šeimai (visos – *aadA1*). Beveik pusė *A.*

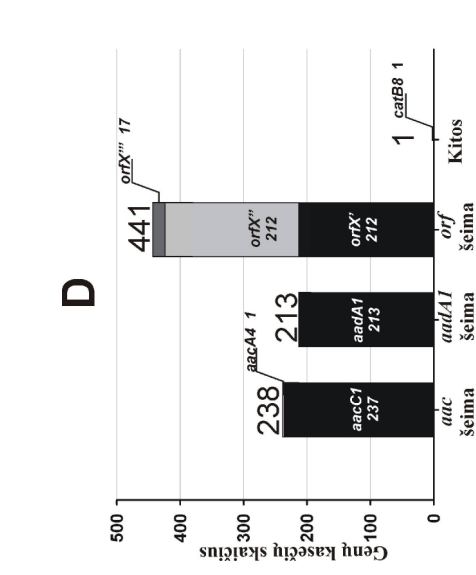
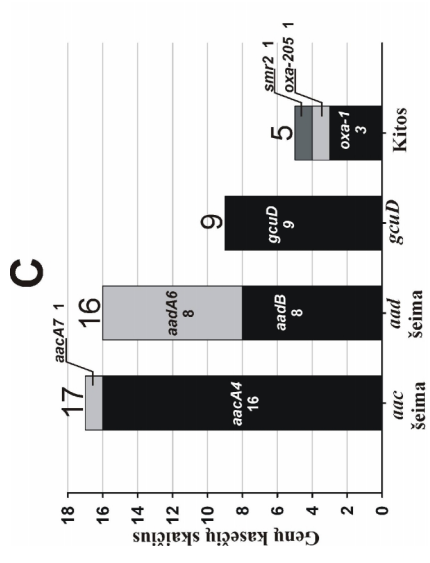
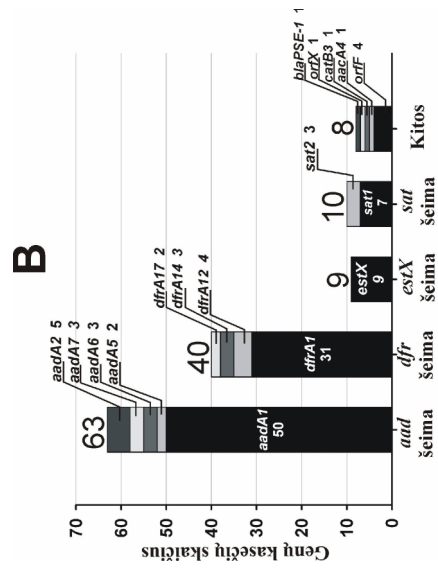
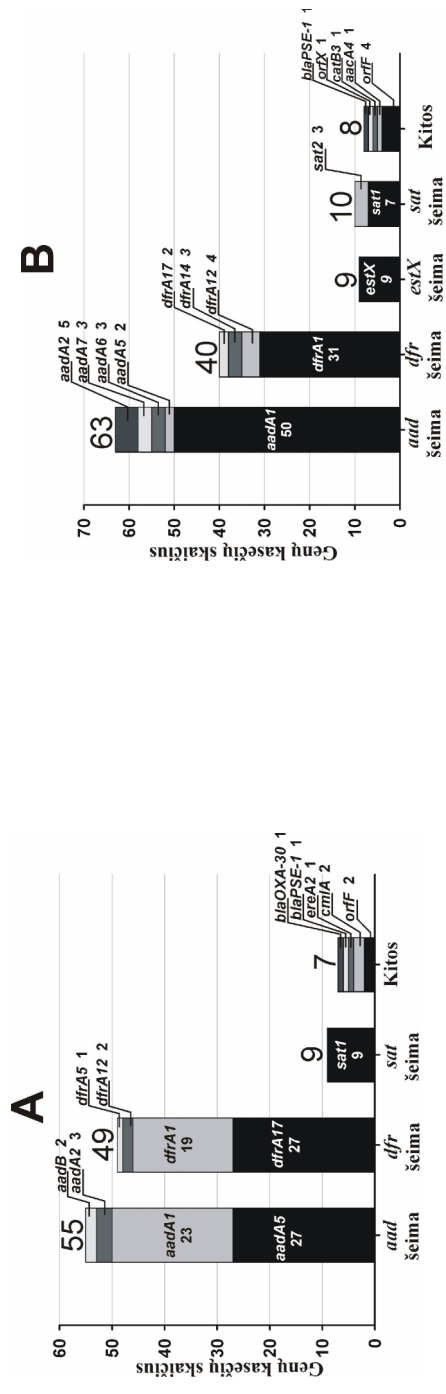
baumannii integronų kasečių (49 %, 441/893) – *orfX'*, *orfX''*, *orfX'''*) kodavo nežinomos funkcijos baltymus. Tik vienos padermės integronas turėjo genų kasetę *catB8*, lemiančią atsparumą chloramfenikoliui (3.2 pav., D).

Lentelė 3.1 Atsparumą antibiotikams lemiančių genų kasetės *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* integronuose.

Genas	Koduojamas baltymas	Atsparumas *	Genų variantai **					
Atsparumas aminoglikozidams								
<i>aadA</i>	Aminoglikozidų 3'-adeniltransferazė	STR	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA5</i>	<i>aadA6</i>	<i>aadA7</i>	
		SPC	<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.) <i>A.b.</i> (k.)	<i>E.c.</i> (k.) <i>S.e.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (k.) <i>S.e.</i> (g.) <i>E.c.</i> (g.) <i>E.c.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (g.) <i>P.a.</i> (k.)	<i>S.e.</i> (g.)	
<i>aadB</i>	Aminoglikozidų 2'-adeniltransferazė	GEN	<i>aadB</i>					
		KAN TOB	<i>E.c.</i> (k.) <i>P.a.</i> (k.)					
<i>aacC</i>	Aminoglikozidų 3'-N-acetiltransferazė	GEN KAN NEO TOB	<i>aacC1</i>	<i>A.b.</i> (k.)				
<i>sat</i>	Streptotricino acetiltransferazė	STC	<i>sat1</i>	<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.)				
Atsparumas trimetoprimui								
<i>dfr</i>	Dihydrofolato reduktazė	TMP	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA5</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA17</i>	
			<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (k.)	<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.)	
Atsparumas β-laktamams								
<i>bla_{OXA}</i>	β-laktamazė	AMP, MEZ, PIP	<i>bla_{OXA-1/30}</i>	<i>bla_{OXA-205}</i>				
			<i>E.c.</i> (k.) <i>P.a.</i> (k.)	<i>P.a.</i> (k.)				
<i>bla_{PSE}</i>	β-laktamazė	AMP CAR	<i>bla_{PSE-1}</i>	<i>S.e.</i> (k.) <i>S.e.</i> (g.)				
Atsparumas chloramfenikoliams								
<i>cat</i>	Chloramfenikolio acetiltransferazė	CHL	<i>catB3</i>	<i>catB8</i>				
			<i>E.c.</i> (g.)	<i>A.b.</i> (k.)				
<i>cml</i>	Chloramfenikolio nešiklis	CHL	<i>cmlA</i>	<i>E.c.</i> (k.)				
Atsparumas kitiems antibiotikams								
<i>ere</i>	Eritromicino esterazė	ERY	<i>ereA2</i>	<i>E.c.</i> (k.)				
<i>smr</i>	Membraninis nešiklis	TET	<i>smr2</i>	<i>P.a.</i> (k.)				
<i>est</i>	Esterazė	Nežinoma	<i>estX</i>	<i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.)				
ORF	Nežinoma	Nežinoma	<i>gcuD</i>	<i>orfF</i>	<i>orfX</i>	<i>orfX'</i>	<i>orfX''</i>	<i>orfX'''</i>
			<i>P.a.</i> (k.)	<i>E.c.</i> (k.) <i>E.c.</i> (g.) <i>S.e.</i> (g.)	<i>E.c.</i> (g.)	<i>A.b.</i> (k.)	<i>A.b.</i> (k.)	<i>A.b.</i> (k.)

* AMP – ampicilinas, AMI – amikacinas, CAR – karbenicilinas, CHL – chloramfenikolis, ERY – eritromicinas, GEN – gentamicinas, KAN – kanamicinas, MEZ – mezlocilinas, NEO – neomicinas, PIP – piperacilinas, STR – streptomocinas, SPC – spektinomocinas, STC – streptotricinas, TOB – tobramicinas, TET – tetraciklinas, TMP – trimetoprimas.

***E.c.*(k.) – klinikinės kilmės *E. coli*; *S.e.*(k.) – klinikinės kilmės *S. enterica*; *E.c.*(g.) – gyvūninės kilmės *E. coli*; *S.e.*(g.) – gyvūninės kilmės *S. enterica*; *P.a.*(k.) – klinikinės kilmės *P. aeruginosa*; *A.b.*(k.) – klinikinės kilmės *A. baumannii*.



3.2 pav. *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* integronų genų kasetės ir jų variantai.
A – klinikinės kilmės *E. coli* ir *S. enterica*; **B** – gyvūninės kilmės *E. coli* ir *S. enterica*; **C** – klinikinės kilmės *P. aeruginosa*; **D** – klinikinės kilmės *A. baumannii*.

3.1.3 I ir II klasės integronų genų kasečių deriniai ir jų paplitimas

Klinikinės kilmės *E. coli* padermėse vyraavo 1600 bp dydžio I klasės *dfrA17 – aadA5* integronas (Lentelė 3.2). Jį turėjo 60 % (25/42) *E. coli*, turinčių I klasės integronus. Antras pagal dažnį šioje grupėje buvo 1500 bp *dfrA1-aadA1* integronas. Šių integronų genų kasetės lėmė atsparumą trimetoprimui ir streptomycinui/spektinomycinui. Didžioji dalis tokių *E. coli* buvo išskirtos iš šlapimo takų infekcijų.

Kitus penkis klinikinės kilmės *E. coli* I klasės integronų tipus turėjo tik pavienės padermės (Lentelė 3.2). Čia verta išskirti dviejose padermėse iš šlapimo takų infekcijų nustatytą neįprastą 4800 bp dydžio I klasės integroną. Jis turėjo unikalų genų kasečių bei kitų genetinių elementų išsidėstymą – *dfrA17-aadA5Δ-IS26-ΔintI1-aadB-aadA1-cmlA* (GenBank nr. GQ402463). Integrono struktūra ir jo genetinė aplinka detaliau išanalizuota ir aprašyta skyriuje 3.1.3.1. Vienintelėje klinikinės kilmės *S. enterica* padermėje, kurioje nustatytas integrazę koduojantis genas *intI1*, buvo aptikti du skirtingi I klasės integronai – 1000 bp *aadA2* ir 1200 bp *bla_{PSE-1}*.

Visose klinikinės kilmės *E. coli* padermėse nustatyti II klasės integronai buvo vieno tipo: integrono dydis – 2200 bp, o VS dalyje įsiterpusi trijų kasečių kombinacija *dfrA-sat1-aadA1*, suteikianti atsparumą trimetoprimui, streptotricinui ir streptomycinui/spektinomycinui. Šis integrono tipas taip pat vyraavo ir gyvūninių padermių grupėje.

Šeši iš dešimties I klasės integronų tipų, nustatytų gyvūninės kilmės *E. coli* ir *S. enterica*, buvo rasti ir *E. coli* bei *S. enterica*, išskirtose iš žmonių infekcijų (Lentelė 3.2). Dažniausias veterinarinėje aplinkoje sutinkamas integronas buvo I klasės 1500 bp integronas *dfrA1-aadA*. 24 % (13/55) gyvūninės kilmės padermių turėjo I klasės integronus, kurie nebuvo nustatyti bakterijose iš klinikinių mėginių. Tarp jų galima išskirti tris *S. enterica* padermes, kurios turėjo unikalų 1800 bp *aadA7-aadA7* integroną (GenBank nr. FJ980455) (Lentelė 3.2).

Lentelė 3.2 I ir II klasės integronų genų kasečių deriniai *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* bakterijose, išskirtose iš žmonių ir gyvūnų. **Sv.** – sveiki gyvūnai; **Sr.** – sergantys gyvūnai.

Bakterijos (padermių skaičius)	<i>E. coli</i> (217)			<i>S. enterica</i> (87)			<i>P. aeruginosa</i> (111)	<i>A. baumannii</i> (444)			
	Žmonės (85)	Vištos (54)		Kiaulės (35)	Galvijai (43)	Žmonės (37)			Vištos (31)	Kiaulės (19)	
		Sv. (27)	Sr. (27)								Sv. (17)
I klasės integronai											
<i>aadA1</i>	1	3	1	2	1	2	1				
<i>dfrA1-aadA1</i>	9	2	3	1	6	10	1				
<i>dfrA17-aadA5</i>	24				1	1					
<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	2	2					2				
<i>dfrA17-aadA5Δ-IS26-ΔintI1-aadB-aadA1-cmlA</i>	2										
<i>dfrA5-ereA2</i>	1										
<i>blaOXA-1/30 - aadA1</i>	1						1	1			
<i>aadA2 + blaPSE-1</i>					1	2					
<i>dfrA14-aadA6</i>								3			
<i>aadA7-aadA7</i>								1			
<i>esiX-aadA1</i>					4	1					
<i>aacA4-catB3-dfrA1-orfX</i>			1						13		
<i>aacA4</i>									6		
<i>aadB</i>									7		
<i>aadA6-gcuD</i>									3		
<i>aacA4-blaOXA-1/30</i>									1		
<i>aadB-blaOXA-205</i>									1		
<i>aacA7-smr2-gcuD</i>									1		
<i>aadB + aadA6-gcuD</i>									1		
<i>aacC1-orfX'-orfX''-aadA1</i>									195		
<i>aacC1-?</i>									25		
<i>aacC1-orfX'-orfX''-orfX'''-aadA1</i>									17		
<i>aacA4-catB8-aadA1</i>									1		
Viso	40	7	5	7	10	15	1	2	7	32	238

Lentelės 3.2 tęsinys

Bakterijos (padermių skaičius)	<i>E. coli</i> (217)							<i>S. enterica</i> (87)			<i>P. aeruginosa</i> (111)	<i>A. baumannii</i> (444)
	Žmonės (85)	Vištos (54)		Kiaulės (35)	Galvijai (43)	Žmonės (37)	Vištos (31)	Kiaulės (19)	Žmonės (111)	Žmonės (444)		
		Sv. (27)	Sr. (27)								Sr. (35)	Sv. (17)
II klasės integronai												
<i>dfrA1-sat1-aadA1</i>	7	1		2								
<i>dfrA1-sat1</i>			1									
<i>estX-sat2-aadA1</i>				1								
Viso	7	1	1	3	3	3	3	3				
I + II klasės integronai												
<i>dfrA1-aadA1 + dfrA1-sat1-aadA1</i>	1											
<i>dfrA17-aadA5 + dfrA1-sat1-aadA1</i>	1											
<i>aadA1 + estX-sat2-aadA1</i>				2								
Viso	2			2								

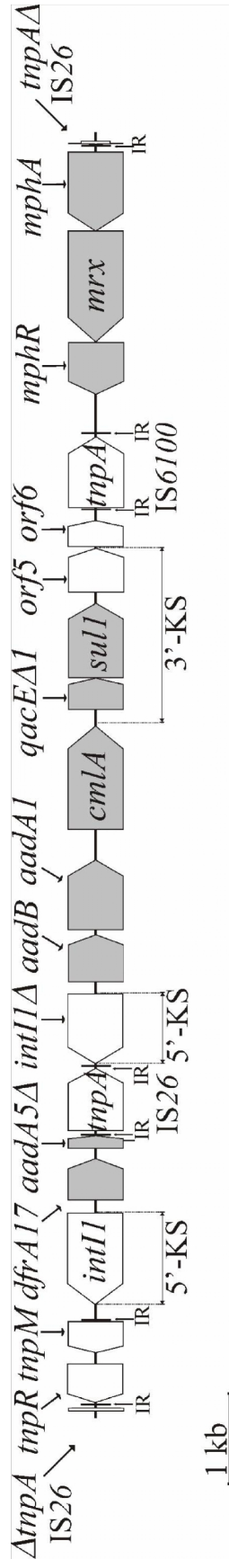
P. aeruginosa ir *A. baumannii* I klasės integronams buvo būdingi kitokie genų kasečių deriniai, nei enterobakterijų integronams (Lentelė 3.2). *P. aeruginosa* iš viso nustatyti šeši skirtingi integronų tipai. Labiausiai paplitę turėjo vieną arba dvi genų kasetes, suteikiančias atsparumą aminoglikozidams – 800 bp *aacA4* (41 %, 13/32), 750 bp *aadB* (22 %, 7/32), 1300 bp *aadA6-gcuD* (25 %, 8/32).

Keturių *P. aeruginosa* padermių I klasės integronuose (3 – 1600 bp *aacA4-bla_{OXA-1/30}* ir 1–1500 bp *aadB-bla_{OXA-205}*) nustatytos kasetės, koduojančios β-laktamazes. *bla_{OXA-205}* geno nukleotidų seka buvo unikali (GenBank nr. JF800667), todėl naujam integronui suteiktas identifikacinis numeris In671 (INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt>). Geno *bla_{OXA-205}* nukleotidų sekos analizė aprašyta skyriuje 3.1.3.2. Vienoje *P. aeruginosa* padermėje nustatytas retas 1400 bp dydžio I klasės integronas *aacA7-smr2-gcuD* (GenBank nr. JF412712). Jame esanti kasetė *smr2* koduoja membraninį nešiklį, suteikiantį atsparumą įvairioms toksinėms medžiagoms (Schuldiner ir kt., 2001).

Klinikinės kilmės *A. baumannii* padermėse nustatyti keturių skirtingų tipų I klasės integronai. Nė vieno jų nerasta kitose tirtose Gram neigiamose bakterijose (Lentelė 3.2). *A. baumannii* integronai turėjo atsparumo aminoglikozidams (*aacC1*, *aadA1*, *aacA4*), fenikolams (*catB8*) genus, taip pat kodavo nežinomos funkcijos baltymus (*orfX'*, *orfX''*, *orfX'''*). Iš 238 *A. baumannii* padermių, kuriose nustatytos I klasės integronų VS, dažniausiai sutinkamas genų kasečių derinys buvo 2500 bp *aacC1-orfX'-orfX''-aadA1* (82 %, 195/238). 7 % (17/238) padermių aptiktas panašus, 3000 bp dydžio integronas *aacC1-orfX'-orfX''-orfX'''-aadA1*, kurio VS dalyje įterptas dar vienas neaiškios funkcijos genas *orfX'''*. Viena padermė turėjo I klasės integroną 2200 bp *aacA4-catB8-aadA1*, o 25 (10 %) padermės turėjo tik VS 5'-dalis pirmąją geno kasetę *aacC1*.

3.1.3.1 I klasės integronas *dfrA17–aadA5Δ–IS26–ΔintI1–aadB–aadA1–cmlA* ir jo genetinė aplinka

Dvi *E. coli* padermės, išskirtos iš šlapimo takų infekcijų toje pačioje ligoninėje, turėjo naują 4800 bp dydžio I klasės integroną. Nustačius jo VS dalies nukleotidų seką (GenBank nr. GQ402463), paaiškėjo, kad ji yra unikali. Integrono VS dalyje nustatytos penkios, atsparumą trimetoprimui, streptomycinui/spektinomycinui, gentamicinui, kanamicinui, tobramicinui ir chloramfenikoliui suteikiančios kasetės *dfrA17*, *aadA5*, *aadA1*, *aadB*, *cmlA* (3.3 pav.). Geno *aadA5* sekoje buvo įsiterpusi IS26 šeimos insercinė seka. Už jos nustatytas nepilnas I klasės integrązę koduojantis genas *intI1* ir trys atsparumą aminoglikozidams ir chloramfenikoliui suteikiančios kasetės. Už genų *qacEΔ1*, *sul1* ir *orf5*, būdingų I klasės integronų 3'-KS dalims, yra įterptas neaiškios funkcijos atviras skaitymo rėmelis *orf6*. Už šios integrono dalies taip pat nustatyta trijų genų sanauka *mphR-mrx-mphA*, koduojanti makrolidų klasei priklausančių antibiotikų išveiklinimo fermentus. Šią sritį iš 3' pusės riboja IS6100 šeimai priklausanti insercinė seka, o iš 5' pusės – antra IS26 insercinės sekos kopija. Šalia integrono 5'-KS dalies nustatyti Tn21 šeimos transpozonomams būdingi transpozicijos fermentus koduojantys genai *tnpM* ir *tnpR*, o pastarojo 3' dalis pertraukta dar viena IS26 šeimos insercinė seka.



3.3 pav. *E. coli* I klasės integrono kintamoji sritis ir genetinė aplinka (GenBank nr. GQ402463). I klasės integrono 5'-KS ir 3'-KS žymi rodyklės. IS26 ir IS6100 invertuotos galinės pasikartojančios sekos (IR) pažymėtos vertikaliais brūkšneliais. Pilka spalva pažymėti su atsparumu antibiotikams susiję genai.

3.1.3.2 I klasės integrono kasetės *bla*_{OXA-205}, koduojančios naują β -laktamazę, nukleotidų sekos analizė

P. aeruginosa, išskirtoje LSMU KK iš akies infekcijos mėginio, nustatyta 1500 bp dydžio I klasės integrono VS dalis, kuri turėjo *aadB* geną ir 798 bp dydžio atvirą skaitymo rėmelį (GenBank nr. JF800667). Nukleotidų sekos analizė ir numanomos aminorūgščių sekos homologų paieška duomenų bazėse parodė, kad šis genas galimai koduoja OXA šeimos β -laktamazę (priskiriama β -laktamazių D klasei pagal Ambler klasifikaciją arba 2d funkinei klasei pagal Bush klasifikaciją; Ambler ir kt., 1991; Bush ir Jacoby, 2010). Tačiau, atlikę lyginamąją aminorūgščių sekos analizę su žinomų β -laktamazių aminorūgščių sekomis, analogų nenustatėme (β -laktamazių duomenų bazė, www.lahey.org/studies). Atvirajam skaitymo rėmeliui buvo suteiktas *bla*_{OXA-205} pavadinimas, o naujam geną turinčiam integronui – numeris In671 (INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt>). Integroną turinti *P. aeruginosa* padermė buvo atspari gentamicinui, imipenemui, amoksicilinui/klavulano r., ampicilinui, tikarcilinui/klavulano r., piperacilinui, piperacilinui/tazobaktamui, tobramicinui, cefuroksimui, trimetoprimui/sulfametoksazolui, ampicilinui/sulbaktamui ir cefalotinui.

Spėjamoje OXA-205 266 aminorūgščių sekoje nustatėme STFK, SXV, YGX, W ir KTG motyvus, būdingus D klasės β -laktamazėms (3.4 pav.). *bla*_{OXA-205} koduojamo baltymo aminorūgščių seka artimiausia OXA-2 pošeimės β -laktamazėms (3.5 pav., A). Atlikę palyginamąją aminorūgščių sekų analizę nustatėme, kad OXA-205 baltymui artimiausių β -laktamazių genai buvo rasti integrone, kurį turėjo nekultivuojamos bakterijos, išskirtos iš nuotekų dumblo Vokietijoje (Tennstedt ir kt., 2003; OXA-119 ir OXA-205 tarpusavio aminorūgščių sekų panašumas 97 %) ir iš klinikinės kilmės *Burkholderia cepacia* padermė, išskirta Airijoje (Crowley ir kt., 2002; OXA-118 ir OXA-205 tarpusavio aminorūgščių sekų panašumas 96 %) (3.5 pav., B). OXA-205 fermentui artimiausia biochemiškai apibūdinta β -laktamazė yra OXA-46 fermentas, skaldantis penicilinus ir siauro spektro cefalosporinus (Giuliani ir kt., 2005; OXA-46 ir OXA-205 tarpusavio aminorūgščių sekų panašumas – 92 %).

```

OXA-3      MAIRIFAILFSTFVFGTFAHAQEGMRERSDWRKFFSEFQAKGTIVVADERQTDREVILVFD 60
OXA-21     MAIRIFAILFSTFVFGTFAHAQEGMRERSDWRKFFSEFQAKGTIVVADERQTDREVILVFD 60
OXA-2      MAIRIFAILFSIFSLATFAHAQEGTLERSDWRKFFSEFQAKGTIVVADERQADRAMLVFD 60
OXA-15     MAIRIFAILFSIFSLATFAHAQEGTLERSDWRKFFSEFQAKGTIVVADERQADRAMLVFD 60
OXA-32     MAIRIFAILFSIFSLATFAHAQEGTLERSDWRKFFSEFQAKGTIVVADERQADRAMLVFD 60
OXA-53     MAIQIFAILFSTFVLATFAHAQDGTLESDWGKFFSDFQAKGTIVVADERQADHAILVFD 60
OXA-118    MAIRFLTILLSTFFLTSFVHAQEHVLESDWKFFSDDLRAEGAIVISDERQAEHALLVFG 60
OXA-119    MAIRFLTILLSTFFLTSFVHAQEHVLESDWKFFSDDLRAEGAIVISDERQAEHALLVFG 60
OXA-205    MAIRFLTILLSTFFLTSFVHAQEHVVVRSDWKFFSDDLQAEGAIVIADERQAEHALLVFG 60
OXA-46     MAIRFFTILLSTFFLTSFVYAQEHVIRSVDWKFFSDDLQAEGAIVIADERQAKHTLSVFD60
          ***:::***: * * : :.::**:*   **** *:::***:***:*****:..: **

OXA-3      QVRSEKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAARDEFQVFRWDGIKRSFAAHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-21     QVRSEKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAARDEFQVFRWDGIKRSFAAHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-2      PVRSKKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAVRDEFQIFRWGDNVNRGFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-15     PVRSKKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAVRDEFQIFRWGDNVNRGFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-32     PVRSKKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAVRDEFQIFRWGDNVNRGFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-53     QARSMKRYSPASTFKIIPHTLFALDAGAVRDEFQIFRWGDKVRSFAGHNKDQDLRSAMRNS 120
OXA-118    QERAARKRYSPASTFKLPHLTFALDADAVRDEFQVFRWDGVKRSFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-119    QERAARKRYSPASTFKLPHLTFALDADAVRDEFQVFRWDGVKRSFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-205    QERAARKRYSPASTFKLPHLTFALDAGAVRDEFQVFRWDGVKRSFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
OXA-46     QERAARKRYSPASTFKIIPHTLFALDADAVRDEFQVFRWDGVNRSFAGHNQDQDLRSAMRIS 120
          * : *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

OXA-3      TVWIYELFAKEIGEDKARRYLKQIIDYGNADPSTSNNGDYWIDGNLAIAAQEQIAFLRKLYH 180
OXA-21     TVWIYELFAKEIGEDKARRYLKQIIDYGNADPSTSNNGDYWIDGNLAIAAQEQIAFLRKLYH 180
OXA-2      TVWVYELFAKEIGDDKARRYLKKIIDYGNADPSTSNNGDYWIEGSLAISAEQIAFLRKLYR 180
OXA-15     TVWVYELFAKEIGDDKARRYLKKIIDYGNAGPSTSNNGDYWIEGSLAISAEQIAFLRKLYR 180
OXA-32     TVWVYELFAKEIGDDKARRYLKKIIDYGNADPSTSNNGDYWIEGSLAISAEQIAFLRKLYR 180
OXA-53     TVWVYELFAKEIGDGKARRYLKQIIDYGNADPSTSHGDYWIEGSLAISAEQIAFLRKLYQ 180
OXA-118    AVWVYELFAKEIGDKARHYLKQIIDYGNADPSTIKGDYWIDGNLEISAHEQISFLRKLYR 180
OXA-119    AVWVYELFAKEIGEDKARRYLKQIIDYGNADPSTIKGDYWIDGNLEISAHEQISFLRKLYR 180
OXA-205    AVWVYELFAKEIGEDNARRYLKQIIDYGNADPSTIKGNYWIDGNLEISAHEQISFLRKLYR 180
OXA-46     TVWVYELFAKDIGEDKARRYLKQIIDYGNVDPSTIKGDYWIDGNLKISAHEQILFLRKLYR 180
          * : *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

OXA-3      NELPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGRIGWVWGWVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-21     NELPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGRMGWVWGWVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-2      NELPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGRMGWVWGWVVEWPTGSVFFALNIDTP 240
OXA-15     NELPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGRMGWVWGWVVEWPTGSVFFALNIDTP 240
OXA-32     NELPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGRMGWVWGWVVEWPTGSVFFALNIDTP 240
OXA-53     NDLPFRVEHQRLVKDLMIVEAGRNWILRAKTGWEGSMGWVWGWVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-118    NQLPFFQVEHQRLVKDLMITEAGRNWILRAKTGWEGFRGWVWGWVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-119    NQLPFFQVEHQRLVKDLMITEAGRNWILRAKTGWEGFRGWVWGWVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-205    NQLPFFQVEHQRLVKYLMITEAGRNWILRAKTGWEGFRGWWIGVVEWPTGPVFFALNIDTP 240
OXA-46     NQLPFFKVEHQRLVKDLMITEAGRSWILRAKTGWEGFRGWVWGWIEWPTGPVFFALNIDTP 240
          * : *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

OXA-3      NRMDDLKREAI VRAILRSIEALPPNPAVNSDAAR 275
OXA-21     NRMDDLKREAI VRAILRSIEALPPNPAVNSDAAR 275
OXA-2      NRMDDLKREAI VRAILRSIEALPPNPAVNSDAAR 275
OXA-15     NRMDDLKREAI VRAILRSIEALPPNPAVNSDAAR 275
OXA-32     NRMDDLKREAI VRAILRSIEALPPNPAVNSDAAR 275
OXA-53     NRMDDLKREAIARAILLSIEALPPNPAVHSDAAR 275
OXA-118    NRTDDLKREAIARAILRSIDALPPN----- 266
OXA-119    NRTDDLKREAIARAILRSIDALPPN----- 266
OXA-205    NRTDDLKREAIARAILRSIDALPPN----- 266
OXA-46     NRTDDLKREAIARAILRSIDALPPN----- 266
          ** *****:*****

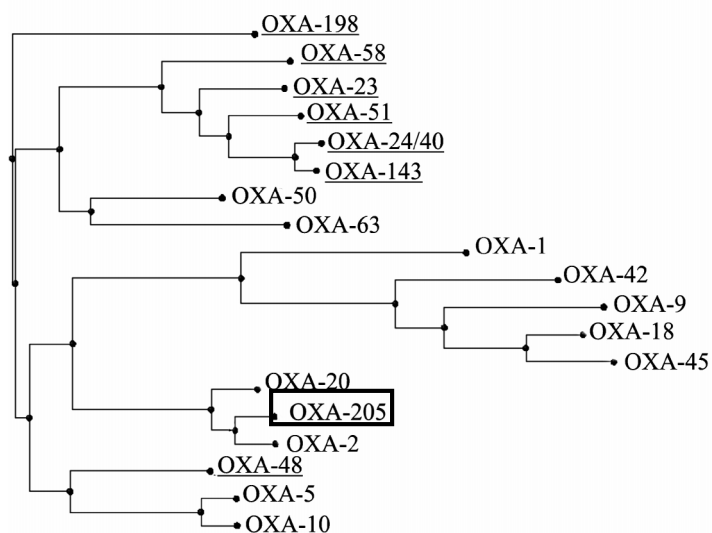
```

3.4 pav. OXA-205 ir D klasės OXA-2 pošeimei priklausančių β-laktamazių aminorūgščių sekų palyginys. Tamsesne spalva pažymėti D klasės β-laktamazės būdingi konservatyvūs elementai.

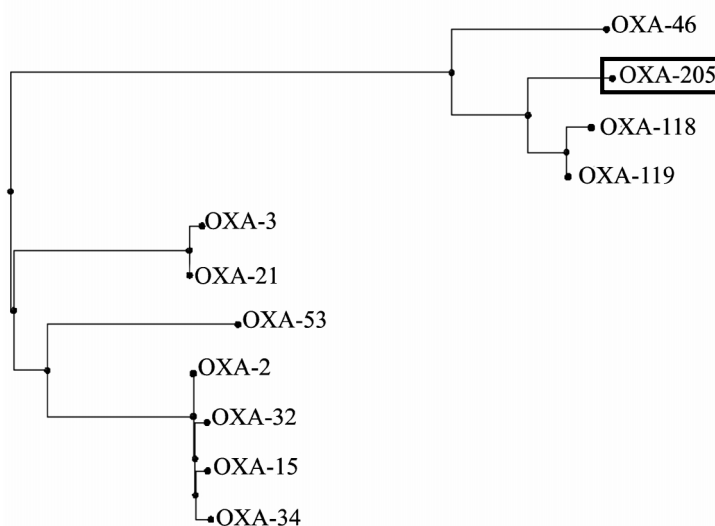
Palyginę OXA-205 aminorūgščių seką su karbapenemus hidrolizuojančių D klasės β-laktamazių aminorūgščių sekomis, nustatėme mažesnę nei 40 % panašumą. *P. aeruginosa* padermė, turinti *aadB-bla*_{OXA-205} integroną, buvo atspari imipenemui (MSK > 16 mg/l), tačiau tolesni *bla*_{OXA-205} klonavimo ir raiškos *E. coli* eksperimentai parodė (R. Krasauskas, neskelbta),

kad OXA-205 karbapenemų neskaido. OXA-205 baltymo dydis buvo ~28 kDa, pI 8,4. Išgryninta β -laktamazė pasižymėjo savitumu siauro spektro β -laktamams (hidrolizavo ampiciliną, karbeniciliną, peniciliną G), tačiau neskaidė imipenemo ir meropenemo bei antros ir trečios kartos cefalosporinų (R. Krasauskas, neskelbta).

A



B



3.5 pav. OXA-205 ir D klasės β -laktamazių filogenetinis medis. Palyginys apskaičiuotas COBALT programa. **A** – OXA-205 ir reprezentatyvių D klasės β -laktamazių (CHDL – pabraukta) filogenetinis medis; **B** – OXA-205 ir OXA-2 pošeimės fermentų filogenetinis medis.

3.1.4. I ir II klasės integronų lokalizacija ir pernaša

Toliau tyrėme, ar nustatyti integronai gali būti pernešami tarp bakterijų. Atlikome konjugacijos eksperimentus su rifampicinui atsparia recipientine *E. coli* HK225 paderme (Kadlec ir Schwarz, 2008). Tikrinome integronų, nustatytų *E. coli* ir *S. enterica* bakterijose, pernašą. *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* integronų pernašos netyrėme, nes tam neturėjome tinkamų recipientų.

Konjugacijos būdu į recipientinę *E. coli* HK225 padermę buvo pernešti 8 iš 13 I klasės integronų tipų ir 2 iš 3 II klasės integronų tipų (Lentelė 3.3). Kaip ir donorinės bakterijos, transkonjugantai įgijo *intI1* arba *intI2* genus, identiški buvo ir integronų kintamųjų sričių amplikonai bei jų RFLP profiliai. Atlikę Southern DNR hibridizaciją nustatėme, kad visi konjugacijos būdu pernešti I klasės integronai yra >50 kb dydžio plazmidėse (Povilonis ir kt., 2010, duomenys neparodyti). Konjugacijos būdu buvo nepernešami gyvūninės kilmės *E. coli* padermėse rastas I klasės integronas *dfrA14-aadA6* ir II klasės integronas *estX-sat2-aadA1*, klinikinės kilmės I klasės integronas *bla_{OXA-1/30}-aadA*. Southern tyrimu nustatėme, kad jie buvo chromosomoje (duomenys neparodyti). *S. enterica* serotipo *Typhimurium* I klasės integronų 1000 bp *aadA2* ir 1200 bp *bla_{PSE-1}* iš klinikinės ir gyvūninės kilmės mėginių konjugacinė pernaša nevyko, o Southern hibridizacija nustatėme, kad jie taip pat yra chromosomoje. Tai patvirtina ir minėtose *S. enterica* padermėse nustatyta serotipo *Typhimurium* DT104 fagotipui būdinga genomine sala (SGI1), kurios sudėtyje yra integronai 1000 bp *aadA2* ir 1200 bp *bla_{PSE-1}*. *S. enterica* serotipo *Typhimurium* fagotipas DT104 nustatytas pagal 16S-23S tarpgeninę sritį (Boyd ir kt., 2001).

Lentelė 3.3 I ir II klasės integronų konjugacinė pernaša ir genetinė lokalizacija.

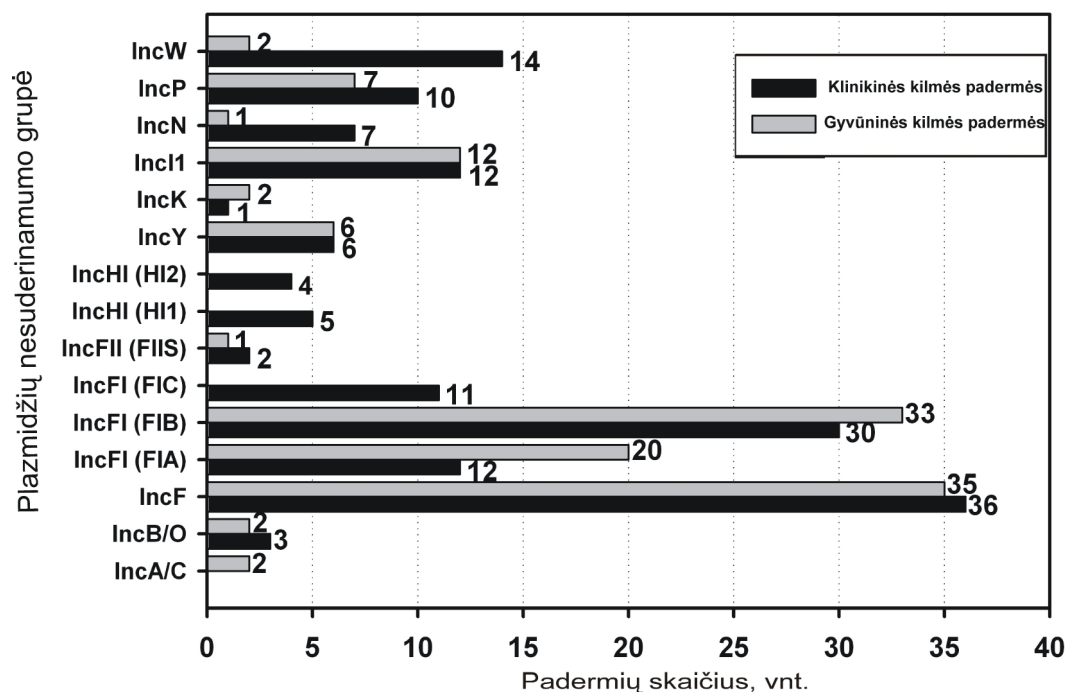
Kintamosios dalies dydis, bp	Genų kasetės	Padermių kilmė *	Konjugacinė pernaša**	Integrono lokalizacija
I klasės integronai				
1000	<i>aadA1</i>	K, V	+	Plazmidė
1500	<i>dfrA1 – aadA1</i>	K, V	+	Plazmidė
1600	<i>dfrA17 – aadA5</i>	K, V	+	Plazmidė
1600	<i>dfrA14 – aadA6</i>	V	-	Chromosoma
1800	<i>aadA7 – aadA7</i>	V	+	Plazmidė
2000	<i>estX – aadA1</i>	V	+	Plazmidė
2000	<i>dfrA12 – orfF – aadA2</i>	K, V	+	Plazmidė
2100	<i>dfrA5 – ereA2</i>	K	+	Plazmidė
2000	<i>bla_{OXA-1/30} – aadA1</i>	K	-	Chromosoma
4800	<i>dfrA17 – aadA5A – IS26 – ΔintI1 – aadB – aadA1 – cmlA</i>	K	+	Plazmidė
2600	<i>aacA4 – catB3 – dfrA1 – orfX</i>	V	ND	ND
1000 + 1200	<i>aadA2 + bla_{PSE-1}</i>	K, V	-	Chromosoma
II klasės integronai				
1300	<i>dfrA1 – sat1</i>	V	+	Plazmidė
2200	<i>dfA1 – sat1 – aadA1</i>	K, V	+	Plazmidė
2500	<i>estX – sat2 – aadA1</i>	V	-	Chromosoma
I + II klasės integronai				
1000	<i>aadA1</i>	V	+	Plazmidė
2500	<i>estX-sat2-aadA1</i>		-	Chromosoma
1500	<i>dfrA1-aadA1</i>	K	+	Plazmidė
2200	<i>dfrA1-sat1-aadA1</i>		+	Plazmidė
1600	<i>dfrA17 – aadA5 +</i>	K	+	Plazmidė
2200	<i>dfrA1 – sat1 – aadA1</i>		+	Plazmidė

* **K** – integronas nustatytas klinikinės kilmės bakterijose, **V** – integronas nustatytas gyvūninės kilmės bakterijose; ** **ND** – integrono pernaša ir genetinės lokalizacija netirta.

3.1.5 Plazmidžių Inc replikonų grupės klinikinės ir gyvūninės kilmės enterobakterijose

PBRT (Carattoli ir kt., 2005) metodu tyrėme, kokios enterobakterijų plazmidžių Inc grupės paplitusios klinikinės ir gyvūninės kilmės bakterijose, turinčiose I arba II klasės integronus. Iš viso nustatėme 15 skirtingų Inc grupių (3.6 pav.). Daugiausia plazmidžių priklausė heterogeninės nesuderinamumo grupės F (IncF) skirtingiems replikonų variantams: IncF_repB 76 % (71/94), IncFIB 67 % (63/94) ir IncFIA 34 % (32/94). Šias plazmidžių Inc grupes turėjo tik *E. coli*. Trys *S. enterica* turėjo kitą IncF replikono variantą – IncFIIS. Kai kurios plazmidžių Inc grupės buvo reikšmingai ($p < 0,01$) dažnesnės veterinarinės kilmės padermėse – IncHI1, IncHI2, IncW, IncN, IncFIC (3.6

pav.). Jokia vyraujanti plazmidžių Inc grupė nebuvo reikšmingai susijusi su konkrečiu integronu. *P. aeruginosa* (n=30) su I klasės integronais neturėjo plazmidžių, priklausančių tirtoms enterobakterijų nesuderinamumo grupėms.



3.6 pav. Enterobakterijų plazmidžių Inc replikonų grupės klinikinės ir gyvūninės kilmės enterobakterijose.

3.2. Antibiotikams atsparių *Acinetobacter baumannii* plazmidžių molekulinės epidemiologijos tyrimas

Antroje šio darbo dalyje didžiausią dėmesį skyrėme klinikinės kilmės *A. baumannii* plazmidžių tyrimui. Tiriamąją imtį sudarė 444 *A. baumannii* padermės, išskirtos iš pacientų klinikinės medžiagos 2010–2011 m. trijose III lygio Lietuvos ligoninėse: LSMU KK, RVUL ir RŠL.

3.2.1 Lietuvos ligoninėse paplitusių *Acinetobacter baumannii* genetinis tipavimas ir vyraujančių klonų nustatymas

Pirmiausiai nustatėme *A. baumannii* padermių genetinę įvairovę ir ligoninėse cirkuliuojančius klonus. Genetiniam tipavimui naudojome PFGE-*ApaI* metodą, paremtą bakterijų chromosomos didelio dydžio restrikcijos (*ApaI* restrikcijos endonukleaze) fragmentų, išskirstytų pulsuojančiame elektriniame

lauke, profilių (pulsotipų) klasterių analizę („Medžiagos ir metodai“, skyrius 2.2.7). Vyraujantiems klonams nustatyti naudojome metodą, kuriuo PGR būdu nustatomi ECI-III klonams būdingi *ompA*, *csuE* ir *bla*_{OXA-51-šeima} genų aleliai (Turton ir kt., 2007). Mūsų žiniomis, tai pirmas tokio pobūdžio HI sukėlėjų genotipų tyrimas Lietuvoje.

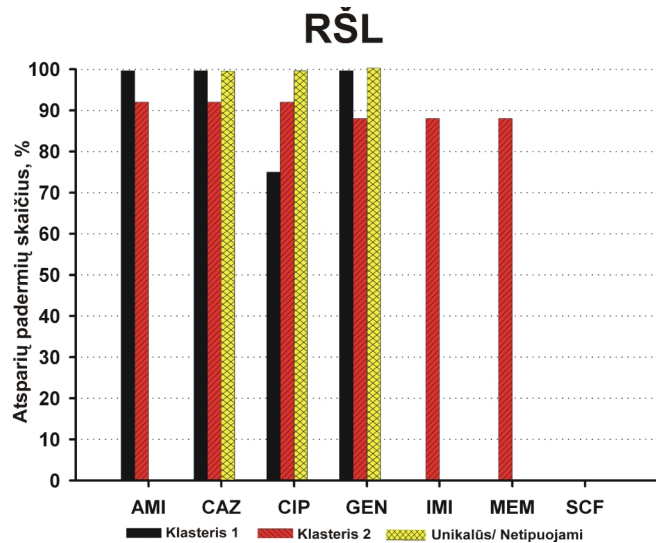
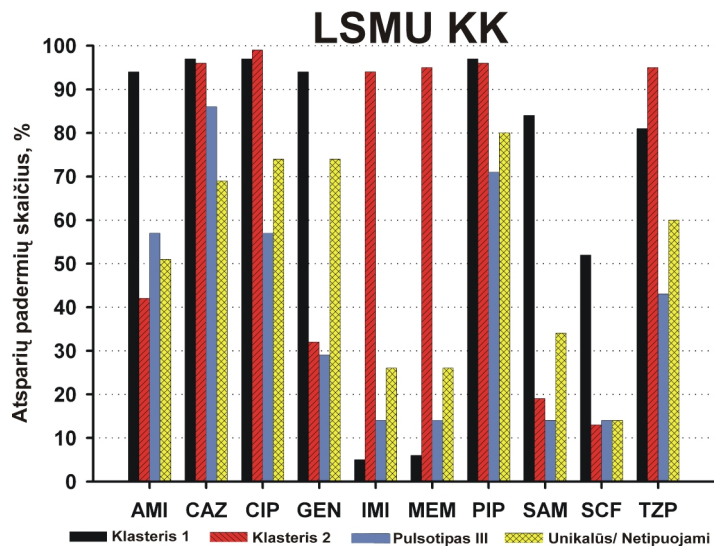
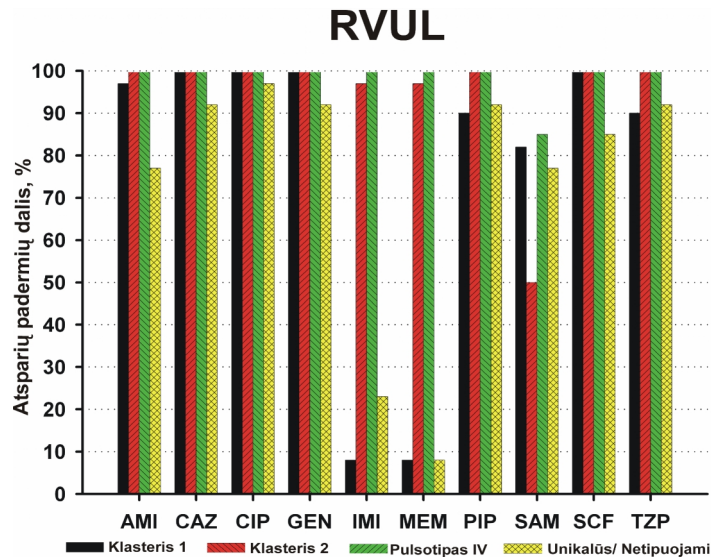
3.2.1.1 *A. baumannii* PFGE-*ApaI* pulsotipai ir EC klonai

Tarp 444 *A. baumannii* padermių iš viso nustatėme 74 skirtingus genetinius profilius – pulsotipus, tarpusavyje besiskiriančius bent vienu PFGE-*ApaI* DNR makrorestrikcijos fragmentu. Taikydami genetinių profilių 80 % tarpusavio panašumo slenkstį (pagal Dice koeficientą), didžiąją dalį pulsotipų (42 pulsotipai; 393/444, 89 %) pagal jų genotipinį panašumą sugrupavome į keturias pagrindines grupes – *Klasterius 1-2* ir *Pulsotipus III-IV* (3.7 pav., priedas 1). Pulsotipams priskiriamų bakterijų padermių makrorestrikcijos profiliai buvo 100 % identiški, tuo tarpu klasteriai buvo sudaryti iš pulsotipų, kurių tarpusavio genotipinis panašumas siekė >80 %. 32 pulsotipų (35/444; 8 %) genetiniai profiliai reikšmingai skyrėsi (<80 % tarpusavio panašumas), todėl juos įvardijome kaip *Unikalius (U1-U15, U18-U34)* (3.7 pav., priedas 1). Beveik visos tirtos *A. baumannii* padermės (97 %, 432/444) priklausė pandeminiams klonams ECI ir ECII – atitinkamai 230 ECI (52 %) ir 202 ECII (45 %). Didžiausioms grupėms – *Klasteriams 1* ir *2* priklausančios *A. baumannii* buvo išskirtos visose trijose ligoninėse ir priklausė pandeminiams klonams ECI ir ECII, atitinkamai (3.7 pav., priedas 1). *Pulsotipui III* priskirtos septynios padermės (ECII klonas) buvo nustatytos tik LSMU KK, o 13 *Pulsotipo IV* padermių (ECI klonas) – tik RVUL (3.7 pav., priedas 1). *A. baumannii* ST tipų nustatymo tyrimas (žr. „Medžiagos ir metodai“, sk. 2.2.13) parodė, kad reprezentatyvios *Klasterio 1* ir *Pulsotipo IV* padermės priklauso ST1 tipui, o *Klasterio 2* ir *Pulsotipo III* padermės – ST2 tipui.

A. baumannii nustatėme ir atsparumą karbapenemams lemiančius genus. Juos turėjo 42 % (188/444) padermių – 174 padermės turėjo *bla*_{OXA-24/40}-šeima geną, 14 – *bla*_{OXA-23}-šeima geną. Beveik visos (172/174) *bla*_{OXA-24/40}-šeima genus turinčios padermės priklausė ECII klonui, o 13/14 *bla*_{OXA-23}-šeima genus turinčių padermių – ECI klonui.

3.2.1.2 Vyraujantiems genotipams priklausančių *A. baumannii* padermių atsparumas antibiotikams

Skirtingoms pulsotipų grupėms (klasteriams) priklausančios *A. baumannii* skyrėsi atsparumo antibiotikams profiliais (3.8 pav.). Visose trijose ligoninėse vyravo *Klasterio 1* ir *2* genotipai (pulsotipai) (3.7 pav., priedas 1). *Klasterio 2* padermių (iš visų ligoninių) ir *Pulsotipo IV* padermių (iš RVUL) statistiškai reikšmingai didesnė dalis buvo atspari abiems karbapenemams – meropenemui ir imipenemui, palyginus su *Klasterio 1* padermėmis ($p < 0,01$). Statistiškai reikšmingai didesnė *Klasterio 1* padermių dalis pasižymėjo atsparumu ampicilinui/sulbaktamui, cefoperazonui/sulbaktamui, gentamicinui ir amikacinui, lyginant su *Klasterio 2* padermėmis ($p < 0,01$). Tačiau ši tendencija nustatyta tik padermėms, išskirtoms LSMU KK. *Klasterio 2* padermės iš RVUL ir RŠL buvo atsparios minėtiems antibiotikams (išskyrus RŠL *Klasterio 2* padermes, kurios buvo jautrios cefoperazonui) (3.8 pav.). Didžioji dalis *Klasterių 1* ir *2* bei *Pulsotipo IV* padermių iš visų ligoninių buvo atsparios piperacilinui/tazobaktamui, ceftazidimui, ciprofloksacinui ir piperacilinui (atitinkamai 81 % – 100 %, 92 % – 100 %, 75 % – 100 %, 90 % – 100 %). Beveik visos RVUL *Pulsotipo IV* padermės buvo atsparios visiems dešimčiai tirtų antibiotikų (3.8 pav.).



3.8 pav. *A. baumannii*, išskirtų Lietuvos ligoninėse, atsparumas antibiotikams. AMI – amikacinas, CAZ – ceftazidimas, CIP – ciprofloksacinas, GEN– gentamicinas, IMI– imipenemas, MEM – meropenemas, PIP– piperacilinas, SAM – ampicilinas/sulbaktamas, SCF – cefoperazonas/sulbaktamas, TZP – tazobaktamas/piperacilinas.

3.2.2 *A. baumannii* plazmidžių homologinių replikonų grupės

Apie *A. baumannii* plazmidžių savybes ir paplitimą iki šiol žinoma labai mažai. Pagal Bertini ir kt. (2010) metodiką atlikome *A. baumannii* plazmidžių tipavimą, remiantis jų replikazes koduojančių *rep* genų – replikonų, skirtumais. Iki šiol žinomi *A. baumannii* plazmidžių replikonai sudaro homologines grupes, 19 tokių grupių sudaro 27 skirtingas replikazes koduojantys genai. Nustatėme, kad iš 444 tirtų padermių 413 (93 %) turėjo vieną arba du replikonus, priklausančius šioms grupėms. Nustatyti replikonai priklausė GR2 (*aci1/2*) ir GR6 (*aci6*) replikonų grupėms (atitinkamai 87 % (385/444) ir 66 % (293/444) tirtų padermių). 60 % (265/444) padermių turėjo abi replikonų grupes. GR2 GR6 replikonų derinys nustatytas 91 % (188/206) *Klasterio 1* padermių (ECI klonas). *Klasterio 2* padermės (ECII klonas), atsparios imipenemui ir meropenemui (OXA-24/40 šeimos karbapenemazių producentai), priešingai, dažniau turėjo tik GR2 replikoną (63 %, 106/167), nei GR2 GR6 derinį (27 %, 45/167), ar vieną GR6 replikoną (4 %, 7/167) ($p < 0,01$). OXA-23 gaminančioms *A. baumannii* (ECI klonas, *Pulsotipas IV*) beveik išskirtinai buvo būdingas GR2 GR6 plazmidžių derinys (12/13). Ši kombinacija taip pat vyravo ir *Pulsotipo III* (ECII klonas) padermėse (5/7). Plazmidžių homologinių replikonų grupių paplitimas *A. baumannii* atskirose ligoninėse buvo panašus. Visose trijose ligoninėse išskirtose *Klasterio 1* padermėse vyravo GR2 GR6 derinys (80–100 %), tuo tarpu *Klasterio 2* padermėse – pavienis GR2 replikonas (50–71 %). Tiesa, išryškėjo nedidelis skirtumas tarp RVUL ir RŠL ligoninėse išskirtų *Klasterio 2* padermių lyginant su to paties klasterio padermėmis iš LSMU KK. Pastarųjų atveju, GR2 GR6 derinį turėjo 19 % (20/103) padermių, o vyraujanti homologinių replikonų grupė buvo GR2 (71 %, 73/103). RVUL ir RŠL ligoninėse išskirtose *Klasterio 2* padermėse GR2 GR6 ir GR2 replikonų pasiskirstymo dažnis buvo panašus: 37 % ir 50 % (RVUL), 42 % ir 54 % (RŠL). Unikaliuose padermėse nepastebėjome žymesnės kokių nors plazmidžių homologinių replikonų grupių vyravimo tendencijos (Lentelė 3.4.)

Lentelė 3.4 *A. baumannii* plazmidžių homologinių replikonų grupės ir ECI-II klonai.

Klasteris pagal PFGE- <i>Apal</i> (padermių skaičius)	Klonas (padermių skaičius)	Plazmidžių homologinių replikonų grupė (padermių skaičius)	Plazmidžių dydžiai pagal PFGE- <i>S1</i> , kb (padermių skaičius)
RVUL (n=103)			
1 (39)	ECI (39)	GR2+GR6 (31) GR2 (1) GR6 (4) ND (3)	9+70 (29) 9+11+70 (2) 70 (1) ND (7)
2 (38)	ECII (38)	GR2+GR6 (14) GR2 (19) GR6 (1) ND (4)	11+70+100 (4) 11+100 (8) 100 (2) 11+70 (6) 11 (14) 9+11 (2) ND (2)
<i>Pulsotipas IV</i> (13)	ECI (13)	GR2+GR6 (12) GR6 (1)	9+70 (12) 9 (1)
<i>Unikalūs</i> (10)	ECI/ECII (4/6)	GR2+GR6 (3) GR2 (1) GR6 (2) ND (4)	6+9+70+100 (2) 9+70+100 (1) 9+70 (3) 11+100 (1) 11 (1) ND (2)
Netipuojami (3)	ECII/ND (1/2)	GR2+GR6 (2) ND (1)	9 (1) 11 (1) ND (1)
LSMU KK (n=304)			
1 (159)	ECI/ECII (157/2)	GR2+GR6 (149) GR2 (3) GR6 (5) ND (2)	9+70 (88) 6+9+70 (35) 6+70 (14) 9 (4) 70 (5) 6 (3) ND (10)
2 (103)	ECII (103)	GR2+GR6 (20) GR2 (73) GR6 (6) ND (4)	11 (80) 11+100 (10) 11+70+100 (5) 70+100 (2) ND (6)
<i>Pulsotipas III</i> (7)	ECII (7)	GR2+GR6 (5) GR6 (2)	9+70 (3) ND (4)
<i>Unikalūs</i> (23)	ECI/ECII/ND (6/10/7)	GR2+GR6 (5) GR2 (6) GR6 (6) ND (6)	9+70 (1) 9 (1) 11 (1) 70 (1) 100 (1) ND (18)
Netipuojami (12)	ECI/ECII/ND (3/7/2)	GR2+GR6 (4) GR2 (3) ND (5)	11 (7) ND (5)

ECI-II – Europinis klonas I-II, ND – nėra duomenų/nenustatyta

Lentelės 3.4 tęsinys

Klasteris pagal PFGE- <i>ApaI</i> (padermių skaičius)	Klonas (padermių skaičius)	Plazmidžių homologinių replikonų grupė (padermių skaičius)	Plazmidžių dydžiai pagal PFGE- <i>S1</i> , kb (padermių skaičius)
RVUL (n=103)			
1 (8)	ECI (8)	GR2+GR6 (8)	9+70 (7) 9 (1)
2 (26)	ECII (26)	GR2+GR6 (11) GR2 (14) ND (1)	6+11+70+100 (13) 6+11+100 (2) 11+70+100 (1) 6+11 (7) 11 (2) 100 (1)
<i>Unikalūs</i> (1)	ND (1)	ND (1)	ND (1)
Netipuojami (2)	ECII (2)	GR2+GR6 (1) GR6 (1)	9+70 (1) 70+100 (1)

ECI-II – Europinis klonas I-II, **ND** – nėra duomenų/nenustatyta

PFGE-*S1* metodu *A. baumannii* iš viso nustatėme penkių skirtingų dydžių plazmidės ~6 kb, ~9 kb; ~11 kb; ~70 kb; ~100 kb (3.9 pav.). Labiausiai paplitusios *Klasterio 1* ir *Klasterio 2* padermės turėjo ~ 70 kb dydžio plazmidę, ji nustatyta atitinkamai 88 % (181/206) ir 19 % (31/167) padermių.

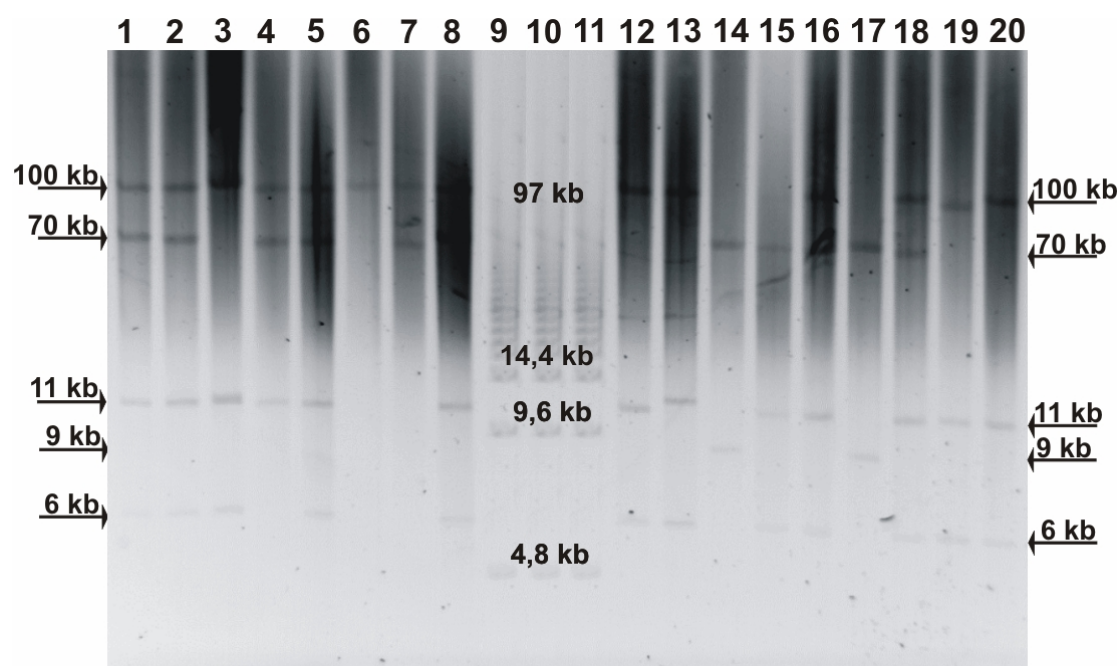
~11 kb dydžio plazmidės buvo būdingos beveik išskirtinai *Klasterio 2* padermėms, priklausančioms ECII klonui ir atsparioms karbapenemams. Iš 167 padermių, kurios turėjo šią plazmidę, 92 % (154/167) buvo *Klasterio 2* padermės. Tik šio klasterio padermėms (neskaičiuojant *Unikalijų* ir netipuojamų padermių) buvo būdinga didžiausia ~ 100 kb plazmidė (29 %, 48/167).

~ 9 kb dydžio plazmidę turėjo karbapenemams jautrios *Klasterio 1* (ECI klonas; 166/206, 81 %), *Pulsotipo III* (ECII klonas; 3/7, 43 %) ir karbapenemams atsparios *Pulsotipo IV* padermės (ECI klonas; 13/13, 100 %). Vertėtų paminėti RŠL išskirtas *Klasterio 2* padermes, kuriose buvo paplitusi mažiausia ~ 6 kb dydžio plazmidė (85 %, 22/26). Panašaus dydžio plazmidę turėjo ir LSMU KK, *Klasterio 1 A. baumannii* (52/159, 33 %) (Lentelė 3.4).

Individualios *A. baumannii* padermės turėjo nuo vienos iki keturių minėtų dydžių plazmidžių (3.9 pav.). Karbapenemams jautrioms *Klasterio 1* padermėms (ECI klonas) buvo būdingas dviejų plazmidžių (9 kb+70 kb)

derinys (60% (124/206). Tokia kombinacija vyravo ir OXA-23 gaminančiose *Pulsotipo IV* padermėse (ECI klonas) iš RVUL (12/13). Didesnę plazmidžių įvairovę nustatėme OXA-24/40 šeimos karbapenemazes gaminančiose *Klasterio 2* padermėse (ECII klonas), kurios turėjo nuo vienos iki keturių skirtingų plazmidžių. Vis dėlto, čia taip pat vyravo tam tikri būdingi plazmidžių deriniai.

RVUL ir LSMU KK išskirtos *Klasterio 2* padermės dažniausiai turėjo vieną 11 kb dydžio plazmidę (RVUL – 14/38, 37 %; LSMU KK – 80/103, 78 %) arba 11 kb+100 kb (RVUL – 8/38, 21 %; LSMU KK – 10/103 (10 %), 11 kb+70 kb (RVUL – 6/38, 16 %), 11 kb+70 kb+100 kb (RVUL – 4/38, 11 %; LSMU KK – 5/103, 5 %) plazmidžių derinius. Kiek kitoks vyraujantis derinys nustatytas *Klasterio 2* padermėse iš RŠL, kur 50 % (13/26) *A. baumannii* turėjo keturių plazmidžių rinkinį 6 kb+11 kb+70 kb+100 kb (Lentelė 3.4).

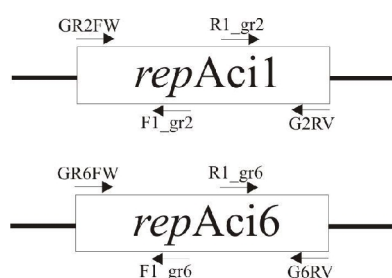


3.9 pav. *A. baumannii* plazmidžių PFGE–S1 tyrimas.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20 – ECII padermės; 14, 17 – ECI padermės; 9, 10, 11 – DNR ilgio žymuo (BIORAD). PFGE–S1 analizė atlikta kaip aprašyta skyriuje “Medžiagos ir metodai”.

3.2.3 *A. baumannii* GR2 homologinių replikonų grupei priklausančių plazmidžių struktūros tyrimas

Toliau tyrėme, kokioms *A. baumannii* plazmidžių homologinių replikonų grupėms priklauso nustatytos plazmidės. Pirmiausiai nustatėme GR2 ir GR6 homologinių replikonų grupėms būdingų genų, koduojančių replikazes *repAci1* ir *repAci6*, nukleotidų sekas. Tuomet sukūrėme oligonukleotidinius pradmenis F1_gr2/R1_gr2 ir F1_gr6/R1_gr6, skirtus padauginti pilno ilgio GR2 ir GR6 plazmidžių amplikonus (3.10 pav.).

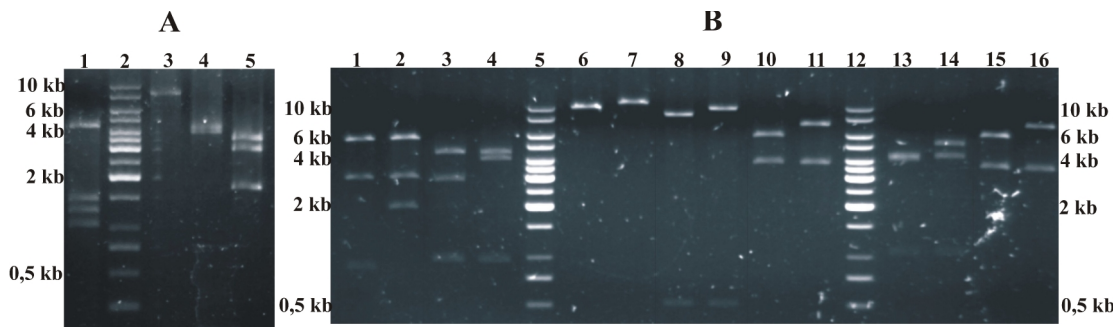


3.10 pav. F1_gr2/R1_gr2 ir F1_gr6/R1_gr6 oligonukleotidinių pradmenų išdėstymo schema.

Tyrėme 16 reprezentatyvių *A. baumannii* padermių, kurios priklausė Klasteriui 1 ir Klasteriui 2, taip pat Unikalių padermių grupei. PGR būdu padauginome viso ilgio plazmidžių DNR (“Medžiagos ir metodai”, skyrius 2.2.2). Su pradmenų poromis F1_gr2/R1_gr2 ir plazmidžių DNR iš Klasterio 1 ir Klasterio 2 *A. baumannii* padermių, susintetinome ~9 kb ir ~11 kb dydžio amplikonus. Amplikonų dydžiai atitiko PFGE-S1 metodu nustatytus plazmidžių dydžius. Su pradmenų pora F1_gr6/R1_gr6 ilgų DNR fragmentų nepavyko susintetinti. Gauti rezultatai leido manyti, kad PFGE-S1 metodu nustatytos ~9 kb ir ~11 kb dydžio plazmidės priklauso GR2 homologinių replikonų grupei. ~70 kb ir ~100 kb plazmidžių replikonų tipų nepavyko nustatyti, nes metodas leido padauginti DNR fragmentus, kurių ilgis siekia iki ~50 kb, tuo tarpu minėtos plazmidės buvo gerokai didesnės. Tai, kad nei su viena pradmenų pora nepavyko padauginti mažiausios, ~6 kb dydžio plazmidės

viso ilgio amplikono, galėtų reikšti, kad šios plazmidės replikonas yra netipuojamas pagal tyrimui naudotą AB-PBRT metodiką.

Iš 16 tirtų reprezentatyvių *A. baumannii* padermių (keturios – iš *Klasterio 1*, devynios – iš *Klasterio 2*, trys – iš *Unikalių* padermių), penkiais atvejais gavome ~9 kb dydžio amplikoną (trys – *Klasterio 1*, du – iš *Unikalių* padermių), o septyniais – ~11 kb dydžio amplikoną (visi – iš *Klasterio 2*). Toliau atlikome GR2 plazmidžių amplikonų restrikcinę analizę. Amplikonų DNR analizavome restrikcijos endonukleazėmis *HindIII*, *XhoI*, *BstXI*, *EcoRI*, *Eco88I*, *PaeI*, *PstI*, *XbaI*, *SalI* (3.11 pav., A ir B). Visų analizuotų ~9 kb amplikonų restrikcijos profiliai buvo vienodi. Visų *A. baumannii* ~11 kb amplikonų restrikcijos profiliai taip pat buvo vienodi, išskyrus vieno (pav. 3.11, B). ~9 kb ir ~11 kb amplikonų restrikcijos profilius (pav. 3.11, A ir B) *in silico* palyginome su panašaus dydžio GR2 plazmidžių p1ABTCDC0715, pAB2, p2ABAYE, pOUR, pMMCU3, pABVA01, pAB0057, pABNA1, pABNA2 (GenBank nr.: CP002523.1, CP000523.1, CU459138.1, EF138630.1, GQ904227.1, FM210331.1, CP001183.1, GQ338082.1, GQ338083.1) restrikcijos profiliais. ~9 kb amplikono restrikcijos profilis (3.11 pav., A) sutapo su žinomų plazmidžių p1ABTCDC0715 (8731 bp) ir pAB0057 (8729 bp) restrikcijos profiliais. ~11 kb amplikono restrikcijos profilis (3.11 pav., B) neturėjo atitikmenų su žinomų plazmidžių profiliais. Tai suteikė pagrindo manyti, kad karbapenemams atspariose, OXA-24/40 šeimos karbapenemazes gaminančiose ECII klonu *A. baumannii* vyraujanti ~11 kb GR2 plazmidė (toliau – pAB120) gali būti unikalios genetinės struktūros, todėl nusprendėme nustatyti visą jos nukleotidų seką.



3.11 pav. *A. baumannii* GR2 plazmidžių amplikonų restrikcijos profiliai.

A – ~9 kb amplikono (ECI padermė K56) restrikcijos fragmentų vaizdas 0,7% agarozės gelyje: **1** – *Hind*III; **2** – 1 kb DNR ilgio žymuo (Fermentas); **3** – pilno ilgio amplikonas (nehidrolizuotas); **4** – *Xho*I; **5** – *Bst*XI.

B – Dviejų ~11 kb amplikonų (ECII padermės K4 ir K60) restrikcijos fragmentų vaizdas 0,7% agarozės gelyje: **1** (K60), **2** (K4) – *Eco*RI; **3** (K60), **4** (K4) – *Eco*88I; **5**, **12** – 1 kb DNR ilgio žymuo (Fermentas); **6** (K60), **7** (K4) – viso ilgio amplikonai; **8** (K60), **9** (K4) – *Pae*I; **10** (K60), **11** (K4) – *Pst*I; **13** (K60), **14** (K4) – *Xba*I; **15** (K60), **16** (K4) – *Sal*I.

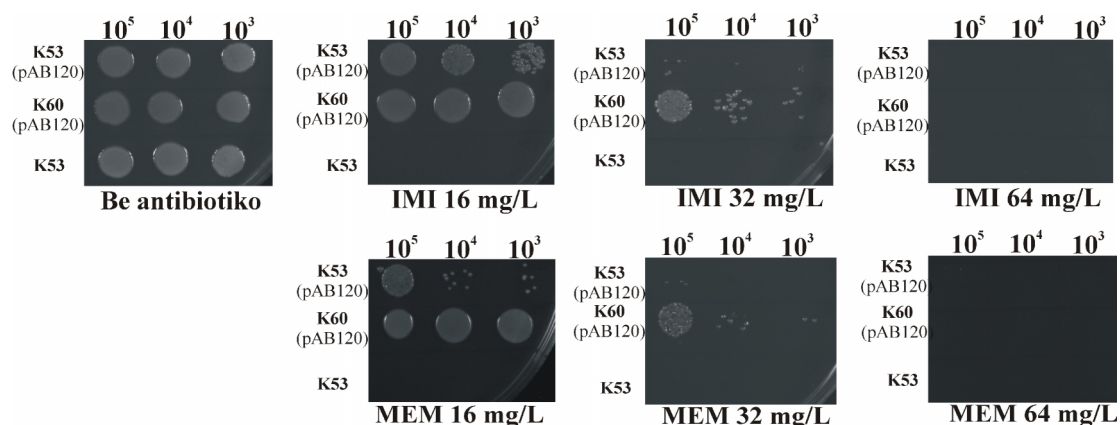
3.2.4 *A. baumannii* GR2 plazmidės pAB120 struktūra

3.2.4.1 pAB120 plazmidės pernaša ir jos suteikiamo atsparumo antibiotikams tyrimas

Spėjamos naujos *A. baumannii* plazmidės nukleotidų sekai nustatyti pasirinkome *A. baumannii* padermę K60, išskirtą LSMU KK iš paciento kvėpavimo takų mėginio. Ši *A. baumannii* buvo atspari imipenemui ir meropenemui ir priklausė *Klasteriui 2* (ECII klonas). Išgryninta plazmidės DNR elektroporacijos būdu buvo pernešta į recipientinę, karbapenemams jautrią *A. baumannii* padermę K53, kurioje nebuvo nustatyta jokia plazmidžių replikonų grupė, o PFGE–S1 tyrimo rezultatai buvo neigiami. Gauti transformantai auginti ant agarizuotos LB terpės su 10 µg/ml imipenemo. *rep* ir *bla*_{OXA-24/40}-šeima genų pernaša buvo patvirtinta PGR su pradmenimis, komplementariais šiems genams.

Toliau tyrėme transformanto (K53+pAB120), recipiento (K53) ir donoro (K60+pAB120) atsparumą antibiotikams minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) metodu (žr. „Medžiagos ir metodai“, skyrius 2.2.14). Donoro (K60+pAB120) ir transformanto (K53+pAB120) padermių MSK reikšmė imipenemui ir meropenemui buvo atitinkamai 64 mg/L ir 32 mg/L

(atsparumo slenkstis pagal EUCAST – >8 mg/L), tuo tarpu recipientinė padermė K53 buvo jautri abiems karbapenemams (MSK <4 mg/L) (3.12 pav.). Tokiu būdu parodėme, kad *Klasterio 2* padermių atsparumą karbapenemams lemianti determinantė *bla*_{OXA-24/40}-šeima yra plazmidėje, kurią įterpus į karbapenemams jautrią *A. baumannii*, joje pasireiškia atsparumo imipenemui ir meropenemui fenotipas.



3.12 pav. *A. baumannii* padermių atsparumo karbapenemams tyrimas.

IMI – imipenemas, MEM – meropenemas. Paveikslėlių viršuje nurodytas tyrime naudotas apytikslis ląstelių skaičius. Minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) tyrimas atliktas kaip aprašyta sk. „Medžiagos ir metodai“.

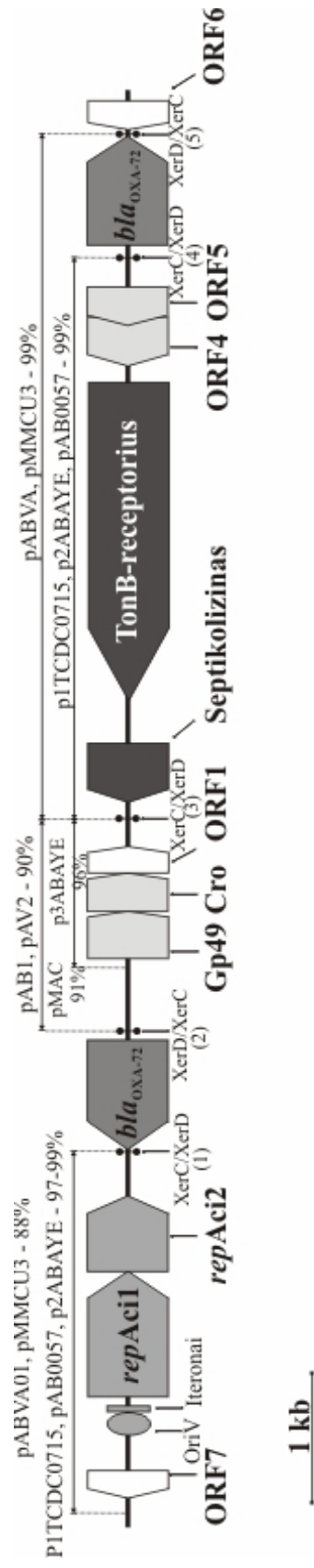
3.2.4.2 *pAB120* plazmidės genetinė struktūra

pAB120 plazmidės nukleotidų seką (GenBank nr. JX069966) nustatėme pradmens poslinkio (angl. *primer walking*) būdu. Naudojome ~11 kb amplikoną, kurį susintetinome naudodami išgrynintą plazmidės DNR iš *A. baumannii* K53 padermės, transformuotos plazmidė *pAB120* (K53+*pAB120*). Plazmidė *pAB120* yra 10879 bp dydžio ir joje nustatėme 13 atvirų skaitymo rėmelių, tarp kurių – dvi kopijas geno, koduojančio OXA-24/40 šeimos β-laktamazę OXA-72, dvi spėjamas toksino-antitoksino (TA) sistemas, kurių kiekviena sudaryta iš dviejų atvirų skaitymo rėmelių – *gp49/cro* ir ORF4/ORF5 (3.13 pav.). Plazmidės replikono sritį sudaro du plazmidės replikacijos iniciacijos baltymus koduojantys genai *repAci1* ir *repAci2*, prieš juos esanti replikacijos pradžios sritis *oriV* ir iteronai – 22 bp sekos 5'-ATATGTCCACGTTTACCTTGCA-3' keturi pasikartojimai, atsakingi už plazmidės replikacijos kontrolę. *pAB120* plazmidėje *bla*_{OXA-72} genai apsupti 28

bp dydžio XerC/XerD rekombinazių atpažinimo sekomis 5'-XXTTXXXATAAXXXXXTTATXXXAAXX-3' (3.13 pav.). pAB120 plazmidė taip pat turi genus, kurių vienas koduoja išorinės membranos baltymą – TonB receptorių, susijusį su geležies jonų pernaša į periplazmą, kitas – baltymą septikoliziną, kurio funkcija *A. baumannii* bakterijose nėra aiški, tačiau, tikėtina, kad jis veikia kaip endotoksinas. Už pastarojo geno yra dar viena XerC/XerD atpažinimo sritis. pAB120 nukleotidų seka labiausiai panaši į GR2 homologinių replikonų grupės plazmidės p1ABTCDC0715, p2ABAYE, pAB0057, pABVA01 ir pMMCU3 (GenBank nr. CP002523.1, CU459138.1, CP001183.1, FM210331.1, GQ904227.1). Labiausiai pAB120 replikono srities (*oriV*, iteronai, *rep* genai) DNR seka buvo panaši (97–99 %) į plazmidžių p1ABTCDC0715, p2ABAYE, pAB0057 replikonų sritis. Plazmidės pABVA01 ir pMMCU3 turi genetinę struktūrą, apribotą XerC/XerD seku, kurioje yra genai, koduojantys septikoliziną, TonB receptorių, spėjama toksino–antitoksino sistemą (ORF4/ORF5) ir *bla*_{OXA-24/40} karbapenemazę (3.13 pav.). Beveik identišką fragmentą nustatėme ir plazmidėje pAB120 (sekos tapatumas – 99 %). Panaši genetinė struktūra, tik neturinti *bla*_{OXA-24/40} ir priešingai orientuota replikono sritimi, yra būdinga ir plazmidėms p1ABTCDC0715, p2ABAYE, pAB0057. Reikšmingiausi skirtumai tarp pAB120 ir kitų panašių *A. baumannii* plazmidžių yra srityse, ribojamose XerC/XerD rekombinacijos sekų (1)-(2) ir (2)-(3) (3.13 pav.). pAB120, už replikazes koduojančių genų *repAci1* ir *repAci2*, yra XerC/XerD sekų apsupta antra *bla*_{OXA-72} geno kopija. Ši sritis p1ABTCDC0715, p2ABAYE ir pAB0057 plazmidėse pakeista kitokio dydžio ir genetinės struktūros fragmentais, kuriuos taip pat riboja XerC/XerD sekos. Be to, tarp XerC/XerD sekų (2)-(3) plazmidėje pAB120 yra įsiterpę *gp49* ir *cro* genai, kurie sudaro spėjama TA sistemą. Panašų DNR fragmentą (90–96 % sekos tapatumas), apsuptą rekombinacijos sekų, turi anksčiau nustatytos genetiškai skirtingos *Acinetobacter* genties bakterijų plazmidės pAB1, pMAC, p3ABAYE ir pAV2 (GenBank CP000522.1, AY541809.1, CU459140.1, DQ278486.1), kurios priklauso skirtingoms homologinių replikonų grupėms. Detali plazmidės

pAB120 struktūros schema, genai, rekombinacijos vietos ir kiti elementai, jų nukleotidų pozicijos parodytos paveiksle 3.13 ir lentelėje 3.5.

Dauginės PGR būdu atlikome plazmidės pAB120 paiešką visoje klinikinės kilmės *A. baumannii* kolekcijoje (444 padermės), naudodami oligonukleotidinius pradmenis, komplementarius plazmidei pAB120 būdingoms sekoms (žr. “Medžiagos ir metodai” sk. 2.1.2). Paaiškėjo, kad pAB120 vyravo karbapenemams atspariose *bla*_{OXA-24/40}-šeima geną turinčiose *Klasterio 2* padermėse, išskirtose visose trijose ligoninėse – šią plazmidę turėjo 95 % (165/174) karbapenemams atsparių ECII klonui priskiriamų padermių (R. Krasausko duomenys).



3.13 pav. Plazmidės pAB120 genitinės struktūros schema (linijinis išsėstymas) (GenBank nr. JX069966).

Virš plazmidės schemos nurodytas atitinkamų jos fragmentų nukleotidų sekos tapatumas (%) kitoms *A. baumannii* plazmidėms.

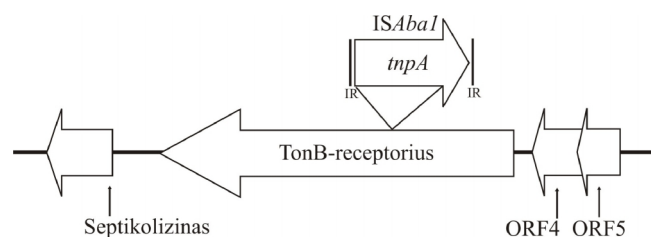
Lentelė 3.5 *A. baumannii* plazmidės pAB120 genetiniai elementai ir jų spėjamos funkcijos.

Pozicija *	Genetinis elementas **	Geno produktas (aminorūgščių sk.) ***	Spėjama funkcija
1–180	<i>oriV</i>	NT	Plazmidės replikacijos pradžios vieta
181–268	Pasikartojanti sritis	NT	Iteronai (4 pasikartojimai); plazmidės replikacijos kontrolė
322–1272	<i>repAci1</i> (+)	316	Plazmidės replikacijos baltymas
1265–1840	<i>repAci2</i> (+)	191	Plazmidės replikacijos baltymas
2147–2174	XerC/XerD	NT	Baltymo jungimosi vieta; rekombinacijos vieta
2185–3012	<i>bla_{OXA-72}</i> (-)	275	Karbapenemus hidrolizuojantis fermentas (oksacilinazė)
3086–3113	XerD/XerC	NT	Baltymo jungimosi vieta; rekombinacijos vieta
3621–3977	Gp49 (+)	118	Spėjama toksino-antitoksino sistema; toksinas
3970–4272	Cro (+)	100	Spėjama toksino-antitoksino sistema; antitoksinas
4265–4474	ORF1 (+)	69	Hipotetinis baltymas
4483–4510	XerC/XerD	NT	Baltymo jungimosi vieta; rekombinacijos vieta
4800–5261	Septikolizinas (-)	153	Spėjamas endotoksinas
5567–7978	TonB receptorius (-)	803	Išorinės membranos baltymas; geležies transportas
8106–8489	ORF4 (-)	127	Spėjama toksino-antitoksino sistema; antitoksinas, citoplazmos baltymas
8407–8703	ORF5 (-)	98	Spėjama toksino-antitoksino sistema; toksinas, vidinės membranos baltymas
8902–8929	XerC/XerD	NT	Baltymo jungimosi vieta; rekombinacijos vieta
9003 - 9830	<i>bla_{OXA-72}</i> (+)	275	Karbapenemus hidrolizuojantis fermentas (oksacilinazė)
9841 - 9868	XerD/XerC	NT	Baltymo jungimosi vieta; rekombinacijos vieta
9874 - 10089	ORF6 (-)	71	Hipotetinis baltymas
10299 - 10517	ORF7 (-)	72	Hipotetinis baltymas

* pAB120 plazmidės nukleotidų sekos numeravimas prasideda nuo *oriV* pirmojo nukleotido;
 ** geno orientacija, (+) – teigiama grandinė, (-) – neigiama grandinė; *** NT – netaikoma.

Skyriuje 3.2.3 minėta, kad analizuojant GR2 plazmidžių ~11 kb dydžio amplikonų restrikcijos profilius, vienos *A. baumannii* padermės (K4) restrikcijos profilis skyrėsi fragmentų skaičiumi ir jų dydžiais (3.11 pav., B). Palyginę jį su pAB120 plazmidės restrikcijos profiliu ir naudodami PGR kartiravimo (angl. *PCR mapping*) būdą su pAB120 sekoskaitai naudotais

oligonukleotidiniais pradmenimis, nustatėme, kad *A. baumannii* padermės K4 ~11 kb dydžio plazmidės struktūra beveik identiška pAB120. Pagrindinis skirtumas buvo srityje, koduojančioje TonB receptoriaus baltymą, kurioje buvo įsiterpęs ~1 kb dydžio fragmentas. Nustačius jo nukleotidų seką, paaiškėjo, kad TonB koduojančiame gene įsiterpusi *A. baumannii* būdinga insercinė seka IS*AbaI* (3.14 pav.)

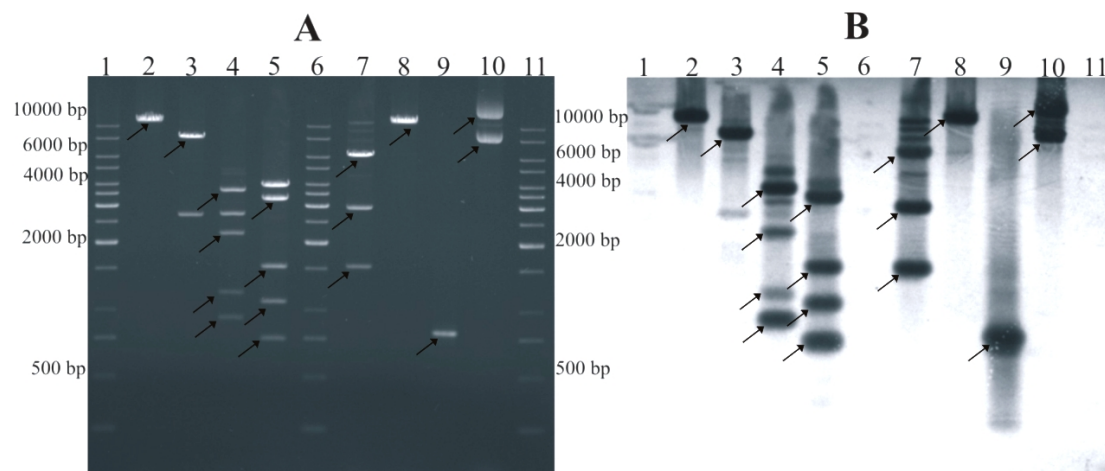


3.14 pav. GR2 ~11 kb plazmidės (*A. baumannii* K4) TonB baltymą koduojančio geno genetinė aplinka.

3.2.4.3 pAB120 plazmidės Southern tyrimas

Norėdami patvirtinti *A. baumannii* GR2 plazmidės pAB120 (GenBank nr. JX069966) genetinę struktūrą, atlikome keletą papildomų eksperimentų. Išgryninę plazmidės DNR iš *A. baumannii* donorinės padermės (K60+pAB120) ir recipiento padermės (K53+pAB120), ją veikėme restrikcijos endonukleazėmis *PstI*, *EcoRV*, *Eco57I*, *BsrDI*, *DraIII* ir *Eco47I*. Restrikcijos fermentai buvo pasirinkti, atsižvelgiant į nustatytą plazmidės pAB120 seką (*PstI* ir *Eco47I* plazmidę linearizuoja, o *Eco57I*, *BsrDI*, *DraIII* – skelia taikinius genuose, koduojančiuose OXA-72 ir abi TA sistemas). Plazmidžių, išskirtų iš donoro (K60+pAB120) ir recipiento (K53+pAB120), restrikcijos profiliai sutapo (duomenys neparodyti). Restrikcijos profiliai sutapo ir su apskaičiuotais jų atitikmenimis *in silico*. Iš *A. baumannii* recipiento K53 išskirtos plazmidės pAB120 restrikcijos fragmentai (3.15 pav., A) analizuoti Southern metodu, naudojant biotinu žymėtą *bla*_{OXA-72} zondą (žr. „Medžiagos ir metodai“, sk. 2.2.8). Rezultatai pateikti paveiksle 3.15 (B). Visi restrikcijos fragmentai, turintys bent dalį geno *bla*_{OXA-72} (pažymėti rodyklėmis), hibridizavosi su *bla*_{OXA-72} zondo DNR. Tokiu būdu, Southern tyrimo duomenys

su natyvos plazmidės DNR patvirtino GR2 plazmidės ~11 kb amplikono sekoskaitos rezultatus.



3.15 pav. Plazmidės pAB120 Southern tyrimas.

(A) Restrikcijos fragmentų profilių vaizdas 0,7 % agarozės gelyje; (B) Southern analizė biotinu žymėtu zonu *bla*_{OXA-72}. **1, 6, 11** – 1 kb DNR ilgio žymuo; **2** – *Pst*I; **3** – *Eco*RV; **4** – *Eco*57I; **5** – *Bsr*DI; **7** – *Dra*III; **8** – *Eco*47I; **9** – *bla*_{OXA-72}; **10** – natyvi plazmidė pAB120. Southern analizė atlikta kaip aprašyta sk. „Medžiagos ir metodai“. Rodyklėmis pažymėti restrikcijos fragmentai, kuriuose yra dalis arba visas *bla*_{OXA-72} genas.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Nustačius visų tirtų klinikinės ir gyvūninės kilmės enterobakterijų, hospitalinių infekcijų sukėlėjų *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* integronų genų kasetes, paaiškėjo, kad didžioji jų dalis koduoja atsparumą antibiotikams lemiančius baltymus. Mūsų tyrimai patvirtino, kad kasetės *aadA*, koduojančios streptomiciną/spektinomiciną išveiklinančias adeniltransferazes, yra vienos dažniausių I klasės integronuose (Povilonis ir kt., 2010; Gassama ir kt., 2004). Manoma, šių genų įterpimas į I klasės integronus, kurie, savo ruožtu, dažnai būna kituose judriuose genetiniuose elementuose (konjugacinėse plazmidėse, transpozonuose), buvo viena iš priežasčių, lėmusių atsparumo streptomicinui plitimą tarp mikroorganizmų (Vakulenko ir Mobashery, 2003). Nors streptomicinas jau gana seniai nebenaudojamas klinikinėje terapijoje, jis vienas, ar kombinacijoje su kitais antibiotikais (β -laktamais, chinolonais, tetraciklinais, trimetoprimu), vis dar lieka populiarus Lietuvoje gydant naminių paukščių, kiaulių, galvijų, avių bakterinės kilmės infekcijas. Lietuvoje įregistruota daugiau nei 10 veterinarinių preparatų, savo sudėtyje turinčių streptomicino (Veterinarinių vaistų registro duomenys, <http://vetlt1.vet.lt/vr/>), tačiau tikslūs jo suvartojimo mastai lieka nežinomi, iš dalies ir dėl neoficialiai į šalį įvežamų neapskaitomų antibiotikų. Šiame darbe *S. enterica* nustatytas naujas I klasės integronas *aadA7* – *aadA7* taip pat liudija galimą bakterijų atsaką į gausų streptomicino naudojimą gyvulininkystėje (Povilonis ir kt., 2010). Per zoonotinius mikroorganizmus atsparumo streptomicinui determinantės, greičiausiai, yra pernešamos į žmonių organizmus ir tokiu būdu vis dar išlieka vienos labiausiai paplitusių I klasės integronuose. Kita vertus, pastebėta, kad integrone *aadA* genui esant kartu su genais, lemiančiais atsparumą kitiems antibiotikams (trimetoprimui, β -laktamams), *aadA* paprastai būna nutolęs nuo promotoriaus P1 per vieną ar dvi genų kasetes. Tai turėtų liudyti silpnesnę jo raišką: kuo geno kasetė integrone yra arčiau promotoriaus, tuo stipresnė jo raiška (Collis ir Hall, 1995).

Enterobakterijų integronuose taip pat dažnos buvo *dfrA* šeimos genų kasetės, lemiančios atsparumą trimetoprimui (Povilonis ir kt., 2010; Šeputienė ir kt., 2010c). Įdomu, kad šie genai nebuvo nustatyti *A. baumannii* ir *P. aeruginosa* integronuose. Tai suteikia pagrindo manyti, kad atsparumą trimetoprimui pastarosiose bakterijose lemia kiti molekuliniai mechanizmai (membraninių siurblių veikla, ne integroninės kilmės genai *fol* ir *dfr*). Didelę *dfrA* genų įvairovę *E. coli* integronuose greičiausiai lemia klinikinėje terapijoje šių bakterijų sukeltųjų infekcijų gydymui plačiai vartojama trimetoprimo – sulfametoksazolo kombinacija, o genų įterpimas į pernešamus genetinius elementus lemia sparčiai plintantį atsparumą šiems antibiotikams (Blahna ir kt., 2006). *dfr* genų įsitvirtinimas integronuose, kuriuos turėjo veterinarinėje aplinkoje paplitusios bakterijos, taip pat nenustebino, nes auginant gyvūnus maistui trimetoprimas plačiai naudojamas antibakterinės terapijos ir profilaktikos tikslais (Mathew ir kt., 2007; Prescott ir kt., 2008). Tačiau, tai nėra vienintelis atsparumo šiam antibiotikui plitimo būdas. Atskirais atvejais pernešamosiose plazmidėse nustatomi atsparumą trimetoprimui lemiantys genai *dfrA8* ir *dfrA14*, kurie yra ne integroninės kilmės (Šeputienė ir kt., 2010c).

E. coli ir *P. aeruginosa* I klasės integronuose aptikome siauro spektro β -laktamazės koduojančius genus *bla*_{OXA-1/30}, lemiančius atsparumą penicilinų klasės antibiotikams. Be to, šie fermentai pasižymi ir silpnu hidrolitiniu aktyvumu prieš siauro spektro cefalosporinus (Aubert ir kt., 2001). Paskutiniųjų metų įvairiose šalyse vykdytų stebėsenos tyrimų rezultatai liudija, kad klinikinės kilmės *E. coli bla*_{OXA-1/30} genai dažnai nustatomi kartu su visame pasaulyje išplitusiu genu, koduojančiu išplėsto spektro β -laktamazę CTX-M-15 (Coque ir kt., 2008). Šias tendencijas patvirtino ir V. Šeputienės bei kolegų atlikti tyrimai, kuriais nustatyta, kad 94 % Lietuvoje išskirtų *E. coli* padermių, gaminančių CTX-M-15, turėjo ir siauro spektro β -laktamazę koduojantį geną *bla*_{OXA-1/30} (Šeputienė ir kt., 2010a). Verta pastebėti, kad šių dviejų determinančių derinys taip pat suteikia bakterijoms atsparumą β -laktamų/ β -laktamazių slopiklių kombinacijai (Poirel ir kt., 2010b).

D klasės β -laktamazės (kitaip dar vadinamom OXA tipo β -laktamazėmis arba oksacilinazėmis) būdinga išskirtinė įvairovė. Šiuo metu žinoma daugiau nei 200 skirtingų jų variantų (www.lahey.org/studies). Klinikinė šių fermentų reikšmė vis auga, nes nemaža jų dalis turi išplėsto spektro hidrolitinį aktyvumą, o dalis jų geba skaidyti ir karbapenemus. Šiuos fermentus koduojantys genai vis dažniau randami įsitvirtinę judriuose genomo elementuose (integronuose, transpozonuose), kas, savo ruožtu, palengvina jų plitimą *Enterobacteriaceae* šeimos, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ir kitų rūšių bakterijose (Giuliani ir kt., 2005; Poirel ir kt., 2010b). Šiame darbe klinikinėje *P. aeruginosa* padermėje nustatyta nauja D klasės β -laktamazė OXA-205 papildoma oksacilinazių įvairovę, kurių nemažai aptinkama klinikinės kilmės *P. aeruginosa* padermėse (El Garch ir kt., 2011; Hocquet ir kt., 2011; Juan ir kt., 2009; Liu ir kt., 2010).

OXA tipo β -laktamazių gausos ir jų išplitimo tarp įvairių patogeninių bakterijų rūšių priežastys lieka diskutuotinos. Viena teorijų teigia, kad tai lėmė prieš kelis milijonus metų vykę keli nepriklausomi genetiniai procesai, kai OXA šeimos baltymus koduojantys genai buvo mobilizuoti iš chromosomos į plazmides (Barlow ir Hall, 2002). Ši hipotezė prieštarauja plačiai paplitusiai nuomonei, kad atsparumo genų įsiterpimas į judriuosius genomo elementus yra antibakterinių preparatų naudojimo rezultatas. Kita vertus tai, kad atsparumo determinantės nustatomos gamtoje sutinkamų bakterijų chromosomose (pvz., OXA-23 *A. radioresistance* chromosomoje), suteikia pagrindą manyti apie natūraliai egzistuojančius gamtinius atsparumo genų rezervuarus, o plazmidėse esančių atsparumo genų įvairovė tiesiog atspindi gamtiniame rezervuare esančių jų pirmtakų įvairovę (Poirel ir kt., 2008). Be to, viena iš pagrindinių tam tikrų OXA tipo fermentus koduojančių genų plitimo varomųjų jėgų galima laikyti ir atrankų antibiotikų spaudimą, sukeltą gausaus β -laktamų vartojimo klinikoje. Taigi, vienu iš ateities iššūkių galima laikyti klinikinėje aplinkoje plačiai naudojamų antibiotikų, sudarančių atrankų spaudimą bakterijoms, įtakos įvertinimą atsparumo determinantėms pernašai iš natūralių gamtinių rezervuarų į kliniškai ir epidemiologiškai svarbias mikroorganizmų rūšis.

Klinikinėje terapijoje vartojamų antibiotikų spektrą atspindi ir pavienėse klinikinės kilmės *E. coli* padermėse nustatyti genai *ereA2* ir *cmlA*, atitinkamai lemiantys atsparumą makrolidų (eritromicinui) ir fenikolių (chloramfenikoliui) klasių antibiotikams (Povilonis ir kt., 2010). Įdomu tai, kad atsparumą chloramfenikoliui lemiantys genai integronuose aptikti klinikinėje ir veterinarinėje aplinkose. Dėl šalutinio šio plataus spektro antibiotiko poveikio jau kuris laikas vengiama jį naudoti klinikinėje terapijoje, o Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba Lietuvoje 2005 – 2007 m. vykdė sugriežtintą chloramfenikolio kontrolės programą pieno pramonėje (<http://vmvt.lt/lt/naujienos/99/>). Tačiau, akivaizdu, kad nesant ar susilpnėjus atrankiam antibiotikų spaudimui, atsparumo determinantės bakterijų genomuose gali išlikti ilgą laiką. Analogišką tendenciją liudija ir *sat1* bei *sat2* genų kasetės, kurias nustatėme klinikinės ir gyvūninės kilmės *E. coli* II klasės integronuose, nors dėl didelio toksiškumo streptotricinas seniai nenaudojamas terapijoje (Hamano ir kt., 2006). Dirvožemio mikroorganizmų (streptomicetų, aktinomicetų ir kt.) gaminamoms antibakterinėms medžiagoms atsparumą suteikiančių determinančių ilgalaikis išsilaikymas patogeniškose bakterijų padermėse taip pat leidžia numanyti apie jų evoliucinį ryšį su natūraliai aplinkoje išplitusiomis mikroorganizmų rūšimis.

Ištirus integronų paplitimo dažnį Lietuvoje išskirtose enterobakterijose, gauti duomenys iš esmės sutapo su analogiškų tyrimų, vykdytų kitose Europos šalyse, rezultatais, kai klinikinėje ir veterinarinėje aplinkoje išskirtose *E. coli* I ir II klasės integronų dažnis atitinkamai siekė 30 – 80 % ir 3 – 15 % (Povilonis ir kt., 2010; Goldstein ir kt., 2001; Guerra ir kt., 2003; Heir ir kt., 2004; Sunde ir Norström, 2006; Cocchi ir kt., 2007; van Essen Zandbergen ir kt., 2007; Kadlec ir Schwarz, 2008; Machado ir kt., 2008). Taip pat reikia atkreipti dėmesį, kad iš sveikų ir sergančių gyvūnų grupių (galvijų ir naminių paukščių) išskirtose padermėse buvo nustatyti bendri integronų tipai, kurie gali būti perduodami konjugacijos keliu (Povilonis ir kt., 2010). Šie duomenys leidžia manyti, kad horizontalios pernašos būdu integronuose esančios atsparumo

antibiotikams genetinės determinantės gali plisti tarp patogeninių ir įprastos mikrofloros *E. coli* padermių.

I klasės integrono genų kasečių derinys *dfrA1-aadA1* buvo dažniausiai sutinkamas ir nustatytas visose tirtose klinikinės ir gyvūninės kilmės *E. coli* grupėse, taip pat tarp *S. enterica* iš paukštienos mėginių (Povilonis ir kt., 2010). Šie rezultatai aiškiai liudija, kad minėtas integrono tipas plinta įvairiose aplinkos nišose išskiriamose *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose, o tokią tendenciją paremia Krauland ir bendraautorių duomenys apie tai, kad integronas *dfrA1-aadA1* yra pasauliniu mastu išplitęs ir tarp *S. enterica* (Krauland ir kt., 2009). I klasės integronai *dfrA17-aadA5* ir *aadA1* pagal paplitimo dažnį taip pat yra vieni iš dažniausiai nustatytų tirtoje bakterijų populiacijoje (Povilonis ir kt., 2010). Šie integronai kartu su jau minėtu integronu *dfrA1-aadA1* yra tarp labiausiai paplitusių *E. coli* padermėse, išskirtose iš klinikinės ir gyvūninės kilmės šaltinių Europoje ir JAV (Dolejská ir kt., 2008; Kadlec ir Schwarz, 2008; Machado ir kt., 2008; Ajiboye ir kt., 2009). Nors I klasės integronas *dfrA12-orfF-aadA2* buvo sutinkamas žymiai rečiau, vis dėlto reikia atkreipti dėmesį, kad jį turėjo tiek klinikinės ir gyvūninės kilmės *E. coli* padermės, tiek *S. enterica* padermės (Povilonis ir kt., 2010). Taigi, mūsų surinkti duomenys liudija, kad šis integronas ir jame esančios kasetės gali būti perduodamos tarp skirtingų bakterijų rūšių.

Dveiose *E. coli* padermėse, išskirtose iš šlapimo mėginių, buvo nustatytas I klasės integronas, kurio įterptų genų kasečių išdėstymas buvo unikalus (Povilonis ir kt., 2010). Integrono struktūra liudija, kad į plačiai paplitusį I klasės integroną *dfrA17-aadA5*, IS26 insercijos būdu buvo įterptas kitas I klasės integronas *aadB-aadA1-cmlA*. 3' dalies analizė leidžia manyti, kad įterptasis fragmentas yra dalis sudėtinio transpozono. Mūsų nustatytas integrono genų kasečių išsidėstymas ir aplink integroną esantys elementai patvirtina bakterijų genomo plastiškumo galimybes, kur svarbų vaidmenį vaidina IS elementai. Dėl jų atsparumo genai įterpimo/pašalinimo procesų metu yra mobilizuojami formuojant sudėtinius transpozonus, kurie, tikėtina,

lema veiksmingą atsparumo antibiotikams genetinių determinančių plitimą tarp rūšių ar rūšies viduje bei patogeninių bakterijų padermių sėkmingą įsitvirtinimą klinikinėje aplinkoje.

Palyginti nedidelis I klasės integronų paplitimas (6 %) nustatytas *S. enterica*, išskirtose iš paukštienos mėginių, o paukštienos gaminiai, manoma, yra vienas iš pagrindinių vaistams atsparių žmonių salmoneliozės infekcijų šaltinių (Povilonis ir kt., 2010; Miko ir kt., 2005). Priešingai, nerimą keliantys rezultatai gauti ištyrus I klasės integronų paplitimą *S. enterica*, išskirtose iš kiaulių skerdienu. Genų kasečių derinių įvairovė ir reikšmingai didesnis integronų paplitimas lyginant su padermėmis, išskirtomis iš paukštienos, suteikia pagrindo manyti, kad kiauliena gali būti reikšmingas šaltinis daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių salmonelių, kurios per mitybos grandinę gali būti pernešamos į žmonių organizmus.

Atliekant integronų genetinės struktūros tyrimus paaiškėjo, kad *S. enterica* padermės, kuriose buvo nustatyti integronai *bla*_{PSE-1} ir *aadA2*, priklausė serotipo Typhimurium DT104 fagotipui (Povilonis ir kt., 2010). Šiam fagotipui būdingas genomo elementas - genomine sala SG1 (jos sudėtinė dalis yra ir integronai *bla*_{PSE-1} bei *aadA2*). Saloje esantys genai padermėms suteikia charakteringą dauginio atsparumo antibiotikams fenotipą (atsparumas ampicilinui, chloramfenikoliui, streptomycinui, sulfonamidams ir tetraciklinui). Manoma, kad daugiatsparių *S. enterica* padermių sukeltos infekcijos pailgina hospitalizacijos laiką (Varma ir kt., 2005), šios padermės gali būti labiau virulentiškos (Rasmussen ir kt., 2005), o chromosomoje įsiterpusių atsparumo determinančių raiška išlieka stabili ilgą laiką net ir nesant atrankiam antibiotikų spaudimui (Mulvey ir kt., 2006).

Enterobakterijų integronų pernašos ir genetinės lokalizacijos tyrimo rezultatai liudija, kad integronai ir juose esančios kasetės gali būti reikšmingas šaltinis atsparumo genų, kurie horizontalios genų pernašos metu gali plisti tarp skirtingų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų rūšių. Tam tikri bendri

integronai bakterijų padermėse, išskirtose iš skirtingų šaltinių, liudija apie galimus atsparumo antibiotikams determinančių pernašos kelius.

A. baumannii padermėse vyraavo I klasės integronas *aacCI-orfX'-orfX''-aadAI*, dalis padermių turėjo labai artimos genetinės struktūros I klasės *aacCI-orfX'-orfX''-orfX'''-aadAI* integroną su papildomu atviru skaitymo rėmeliu *orfX'''* (Povilonis ir kt., 2013). Anot kai kurių tyrėjų, pastarasis integronas galėjo būti prototipas, iš kurio homologinės rekombinacijos arba integrazės kontroliuojamu būdu buvo pašalinta viena neaiškios funkcijos geno kopija, taip susiformuojant integronui *aacCI-orfX'-orfX''-aadAI* (D'Arezzo ir kt., 2009). Per pastarąjį dešimtmetį stebimas šių abiejų integronų plitimas ir išsilaikymas tarp *A. baumannii*, kurios priklauso pandeminiams ECI ir ECII klonams ir sukelia hospitalinių infekcijų protrūkius įvairiose Europos šalyse. Tai leidžia manyti, kad susiformavusios integronų kintamosios dalys pasižymi išskirtiniu genetiniu stabilumu, o genų kasetės bei galima jų pernaša lemia vienodą atsparumo antibiotikams fenotipą geografiškai ir epidemiologiškai nepriklausomose *A. baumannii* padermėse (Nemec ir kt., 2004; Zarrilli ir kt., 2004; Turton ir kt., 2005; Kraniotaki ir kt., 2006; D'Arezzo ir kt., 2009). Manoma, kad infekcijų protrūkių sukeliančių *A. baumannii* genotipinė diferenciacija galėjo vykti jau susiformavus minėtų integronų kintamosioms dalims (Gombac ir kt., 2002).

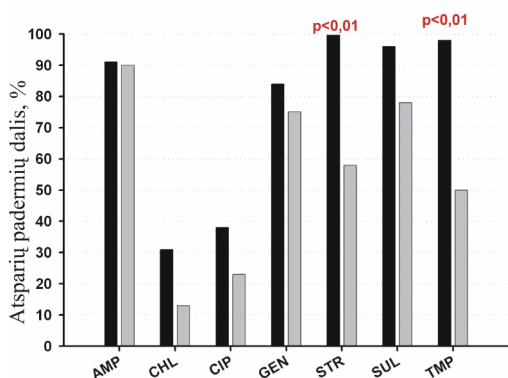
Sunku vienareikšmiškai vertinti *A. baumannii* integronuose esančių atsparumo genų sąsają su atsparumo fenotipu. Nors kai kuriose ligoninėse tam tikrose klonų grupėse atsparių amikacinui ir gentamicinui padermių dalis viršijo 80 %, tačiau jų integronai neturėjo kintamųjų dalių su atsparumą aminoglikozidams suteikiančiais genais. Tai leidžia manyti, kad nepaisant artimos bakterijų genetinės kilmės, skirtingose ligoninėse atsparumas tam tikriems antibiotikams gali formotis ir plisti dėl skirtingų molekulinį mechanizmų. Be to, norint geriau suprasti skirtingose ligoninėse vyraujančių genetiškai artimų padermių nevienodą atsparumo antibiotikams fenotipą,

reikėtų detaliau paanalizuoti ir atsižvelgti į skirtingose ligoninėse nevienodai infekcijų gydymui pasirenkamus antibiotikus.

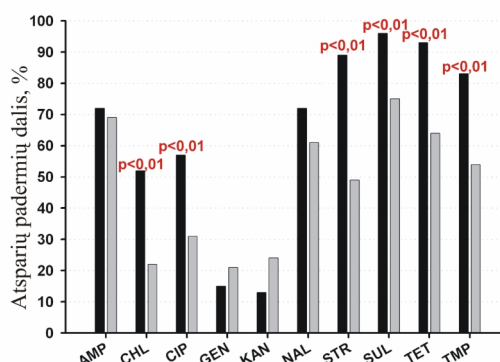
P. aeruginosa nustatyti 6 skirtingų tipų I klasės integronai. Nerimą kelia tai, kad integronus turėjo beveik trečdalis tirtų *P. aeruginosa* padermių, ir beveik visuose integronuose nustatyti *aadB*, *aacA4*, *aacA7* genai, lemiantys atsparumą aminoglikozidams. Statistiškai patikimai daugiau padermių, turinčių integronus, buvo atsparios gentamicinui ir tobramicinui, lyginant su padermėmis, kurios integronų neturėjo (4.1 pav.). Žinant, kad *P. aeruginosa* yra natūraliai atspari daugeliui antibiotikų dėl apvalkalėlio laidumo barjero ir ypač aktyvių daugiavaisčio atsparumo siurblių, o aminoglikozidai laikomi vienu iš nedaugelio veiksmingų antibiotikų prieš *P. aeruginosa*, integronais plintančios atsparumo determinantės labai susiaurina *P. aeruginosa* infekcijų gydymui pasirenkamų antibiotikų spektrą. Taip pat verta atkreipti dėmesį į I klasės integroną *aacA7-smr2-gcuD*, nustatytą *P. aeruginosa* iš kvėpavimo takų mėginio. Kiek žinoma, toks integronas buvo nustatytas tik pavieniais atvejais Turkijoje (Ozgunus ir kt., 2007) ir Rusijoje (nepublikuoti duomenys, INTEGRALL duomenų bazė, <http://integrall.bio.ua.pt/>). Geografiškai skirtingose vietovėse aptinkamas toks pats retas integronas liudija, kad nauji integronų kasečių deriniai gali formotis nepriklausomai nuo epidemiologinės bakterijų prigimties ir geografinės aplinkos.

I ir II klasės integronai yra ne tik atsparumo genų pernašos ir raiškos platformos, bet ir dauginio atsparumo fenotipu pasižyminčių bakterijų molekuliniai žymenys. Padermės, kuriose buvo nustatyti integronai, buvo atsparios net iki dešimties skirtingų antibiotikų. Integronus turinčios padermės pasižymėjo didesniu atsparumo paplitimo dažniu beveik visiems tirtiems antibiotikams, lyginant su padermėmis, kurios integronų neturėjo (4.1 pav.).

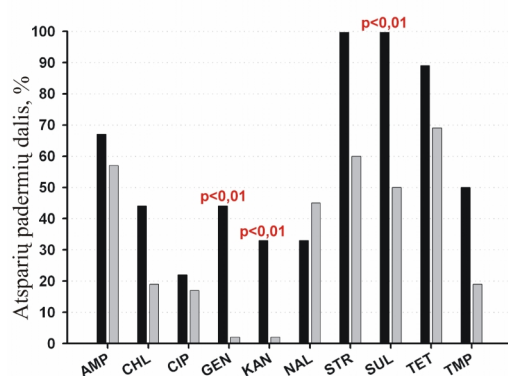
E. coli (klinikinės kilmės)



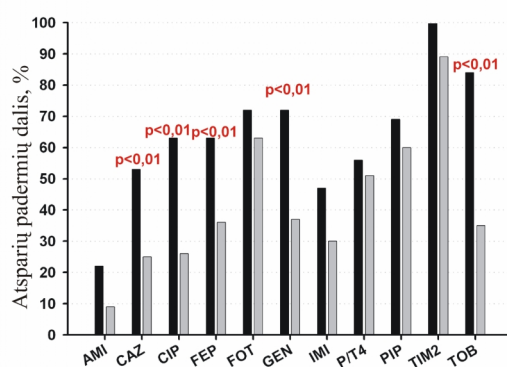
E. coli (gyvūninės kilmės)



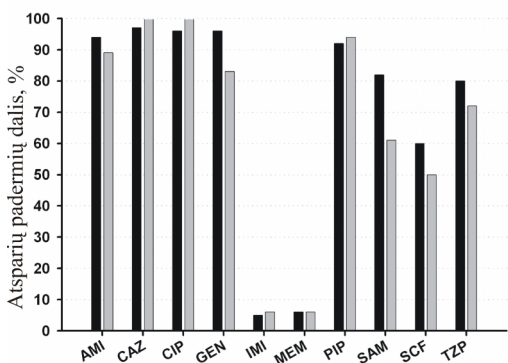
S. enterica (gyvūninės kilmės)



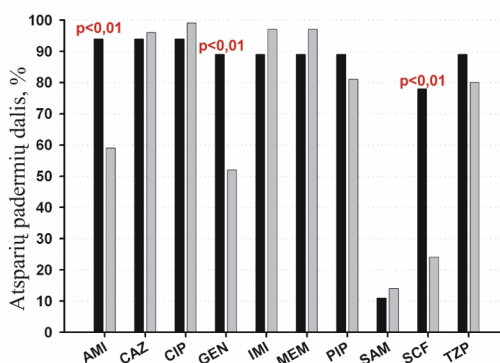
P. aeruginosa



A. baumannii (Klasteris 1)



A. baumannii (Klasteris 2)



4.1 pav. Integronus turinčių/neturinčių *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* atsparumas antibiotikams.

AMP – ampicilinas, AMI – amikacinas, CAZ – ceftazidimas, CHL – chloramfenikolis, CIP – ciprofloksacinas, FEP – cefepimas, FOT – cefotaksimas, GEN – gentamicinas, IMI – imipenemas, KAN – kanamicinas, MEM – meropenemas, NAL – nalidikso rūgštis, PIP – piperacilinas, P/T4 – piperacilinas/tazobaktamas, SAM – ampicilinas/sulbaktamas, SCF – cefoperazonas/sulbaktamas, STR – streptomicinas, SUL – sulfonamidai, TET – tetraciklinas, TMP – trimetoprimas, TIM2 – tikarcilinas/klavulano rūgštis, TOB – tobramicinas, TZP – piperacilinas/tazobaktamas.

Lyginant skirtingas bakterijų grupes, buvo taikomas χ^2 arba Fisher testas. p reikšmei esant <0,01, buvo laikoma, kad skirtumas yra statistiškai reikšmingas (paveiksle pažymėta raudona spalva).

Įdomu tai, kad lyginant integronus turinčias/neturinčias enterobakterijų grupes, stebima statistiškai didesnė padermių dalis, atspari antibiotikams, kuriems integronai atsparumo nekoduoja – chloramfenikoliui, ciprofloksacinui, tetraciklinui, gentamicinui, kanamicinui (*E. coli* ir *S. enterica*; 4.1 pav.). Panašią reikšmingą sąsają pastebėjome ir hospitalinių infekcijų sukėlėjų grupėje: didesnė dalis padermių, turinčių integronų, pasižymėjo atsparumu cefepimui, ceftazidimui, ciprofloksacinui (*P. aeruginosa*; 4.1 pav.), cefoperazonui/sulbaktamui (*A. baumannii*; 4.1 pav.), lyginant su integronų neturinčiomis padermėmis. Tai leidžia manyti, kad integronus turinčios patogeninių bakterijų padermės galbūt pasižymi geriau išreikštu genomo plastiškumu, pasireiškiančiu didesniu imlumu svetimai DNR konjugacijos, transformacijos būdais, palankesne genetinė aplinka naujų molekulinė mechanizmų formavimuisi ir įsitvirtinimui. Todėl, esant atrankiam vaistų spaudimui, lygiagrečiai vystosi atsparumas kelių skirtingų klasių antibiotikams.

Atsižvelgiant į nevienodą atitinkamais laikotarpiais išskirtų bakterijų padermių skaičių, sunku vertinti integronų plitimo dinamiką ir jos kitimo tendencijas per visą tyrimo periodą (2005 – 2011 m.). Ilgalaikiai ir nuoseklūs visuomenėje įgyjamų ir hospitalinių infekcijų, taip pat zoonozių sukėlėjų molekulinės epidemiologijos stebėsenos tyrimai leistų ne tik užfiksuoti atsparumą antibiotikams lemiančių genetinių determinančių spektrą, jų plitimo dinamiką ir kryptis, bet ir anksti nustatyti naujai šalyje pasirodančius dauginiu atsparumu pasižyminčius bakterijų klonus, laiku lokalizuoti jų sukeltamų infekcijų židinius, plėtoti prevencijos programas, prognozuoti klinikinės ir veterinarinės terapijos sėkmę ir siūlyti naujus gydymo sprendimus.

Itin grėsminga padėtis pastaraisiais metais susidarė Lietuvos ligoninėse, jose išplitus atsparioms antibiotikams *A. baumannii* bakterijoms. Per 2008 – 2011 m. atsparių karbapenemams padermių dalis išaugo keletą kartų (Povilonis ir kt., 2013). Kaip parodė šiame darbe atlikti tyrimai, ligoninėse išplito pandeminiai *A. baumannii* klonai ECI ir ECII, cirkuliuojantys daugelyje kitų šalių (Higgins ir kt., 2010). Didžioji dalis ECI padermių sudarė genetiškai

artimų genotipų grupę *Klasterį 1*, o ECII padermės - *Klasterį 2*. Abiejų grupių *A. baumannii* skyrėsi fenotipiniu atsparumu antibiotikams ir atsparumą jiems suteikiančių genų rinkiniais (Povilonis ir kt., 2013). *Klasterio 2* ECII *A. baumannii* buvo nustatytos visose tirtose ligoninėse ir buvo atsparios karbapenemams. Šią savybę nulėmė sintetinės OXA-24/40 šeimos β -laktamazės. Priešingai, *Klasterio 1* ECI padermės buvo jautrios karbapenemams, tačiau reikšmingai didesnė jų dalis lyginant su *Klasterio 2* ECII padermėmis, buvo atsparios aminoglikozidams. Įdomu tai, kad tik vienoje ligoninėje nustatytas OXA-23 šeimos β -laktamazės gaminančių ECI *A. baumannii* padermių protrūkis. Tai liudija apie kliniškai svarbių sukėlėjų klonų galbūt lokalią prigimtį. Ankstyvas tokių protrūkių nustatymas leistų imtis prevencinių priemonių, siekiant išvengti šių klonų platesnio masto išplitimo. Tampa akivaizdu, kad dėl atsparių antibiotikams *A. baumannii* ECI ir ECII klonų plitimo Lietuvos ligoninėse būtina nedelsiant taikyti griežtesnę hospitalinių infekcijų kontrolę. Be to, atsižvelgiant į cirkuliuojančius atskirose ligoninėse atsparumu karbapenemams pasižyminčius *A. baumannii* genotipus, reikėtų svarstyti alternatyvią karbapenemams antibiotikų terapiją.

Plazmidės yra svarbūs atsparumo antibiotikams išsilaikymo ir plitimo genetiniai elementai bakterijose. Gauti duomenys apie tai, kad integronų turinčiose enterobakterijose dažniausios plazmidžių replikonų grupės buvo IncF, koreliuoja su kitose šalyse nustatomomis epideminėmis *Enterobacteriaceae* plazmidėmis, susijusiomis su atsparumu antibiotikais (Carattoli, 2009). IncF grupės plazmidėse itin dažnai nustatomi visame pasaulyje pandeminiu mastu paplitę ESBL koduojantys genai *bla*_{CTX-M-15} (Carattoli, 2009). *E. coli* padermėse, gaminančiose dažniausiai Lietuvoje nustatomą ESBL CTX-M-15 (Šeputienė ir kt., 2010a), nustatyti vienas ar keli IncF grupei priskiriami replikonai (duomenys neparodyti). Tiesa, neretai IncF grupės plazmidės nustatomos ir sveikų žmonių bei gyvūnų bakterijų padermėse, kurios nėra atsparios antibiotikams (Johnson ir kt., 2007). Be to, enterobakterijų IncF plazmidėse dažnai randami ne tik atsparumo antibiotikams genai, bet ir su bakterijų patogenezė susiję elementai – pvz.,

toksinus koduojantys genai, kiti virulentiškumo veiksniai (Carattoli, 2009). Akivaizdu, kad IncF plazmidės vaidina svarbų vaidmenį patogeninėms bakterijų rūšims įgyjant naujų savybių, suteikiančių pranašumą prisitaikant aplinkoje.

Nors yra žinoma kai kurių plazmidžių Inc grupių sąsaja su tam tikrų atsparumo genų pernaša, nenustatėme jokios reikšmingos koreliacijos tarp Inc grupės ir I/II klasės integronų tipų. Tikėtina, kad integronų lokalizacija plazmidėse pirmiausia priklauso nuo transpozonų, kuriuose įprastai yra integronai, tipo ir atitinkamų transpozazių atpažinimo taikinių egzistavimo plazmidėse.

Apie *A. baumannii* plazmidžių epidemiologiją ir sąsajas su atsparumo antibiotikams genais žinoma mažai. Tik 2011 m. atliktas bene pirmasis reprezentatyvus tyrimas apie plazmidžių homologinių replikonų grupių paplitimą *A. baumannii* iš 17 Europos šalių ligoninių (Towner ir kt., 2011). Mūsų darbe gauti duomenys apie tai, kad *A. baumannii* padermėse paplitę GR2 (*repAci1* ir *repAci2*) ir GR6 (*repAci6*) replikonų tipai, patvirtina, kad mūsų šalyje cirkuliuoja ir visoje Europoje paplitę klonai (Povilonis ir kt., 2013).

Atskiro aptarimo verta nustatyta nauja GR2 plazmidė pAB120, kurią turėjo karbapenamams atsparios *A. baumannii* ECII padermės. Plazmidė turėjo du XerC/XerD rekombinazių atpažinimo sekomis apsuptus genus, koduojančius OXA-24/40 šeimos karbapenamazę OXA-72, taip pat genus, koduojančius spėjamas toksino-antitoksino sistemas, kurios gali būti svarbios plazmidžių išsilaikymui bakterijų populiacijoje (Povilonis ir kt., 2013). XerC/XerD rekombinacijos sekomis apriboti įvairių dydžių ir struktūrų nukleotidų sekos fragmentai nėra retas reiškinys *A. baumannii* plazmidėse (D'Andrea ir kt., 2009; Merino ir kt., 2010; Tian ir kt., 2011; Grosso ir kt., 2012). Pagrindinė XerC/XerD rekombinacijos sistemos fermentų funkcija, manoma, yra atskirti plazmidžių ir chromosomų dimerus replikacijos ir ląstelės dalijimosi metu (Summers ir Sherratt, 1988). XerC/XerD rekombinazės atpažįsta ~ 28 bp dydžio *dif* sekas, kuriose du konservatyvūs invertuoti pasikartojimai (IR) atskirti 6 bp kintamos sekos jungtuku (Carnoy ir Roten,

2009). Pastaraisiais metais iškelta hipotezė, kad XerC/XerD fermentai veikia kaip sričiai savitos rekombinacijos sistema, kuri gali būti atsakinga už karbapenemazes koduojančių genų *bla*_{OXA-24/40-šeima} mobilizaciją *Acinetobacter* rūšių bakterijose (Merino ir kt., 2010; D'Andrea ir kt., 2009). XerC/XerD fermentus ir rekombinacijai reikalingus papildomus baltymus koduojantys genai nustatyti kai kurių *A. baumannii* padermių, kurių genomų sekos yra žinomos, chromosomoje (Merino ir kt., 2010).

A. baumannii plazmidžių, turinčių *bla*_{OXA-24/40-šeima} genų, apsuptų XerC/XerD atpažinimo sekomis, nustatyta Ispanijoje, Italijoje, Portugalijoje, JAV ir Kolumbijoje (D'Andrea ir kt., 2009; Merino ir kt., 2010; Tian ir kt., 2011, Grosso ir kt., 2012; Montealegre ir kt., 2012). Taip pat parodyta, kad ta pati *A. baumannii* gali turėti kelias skirtingas plazmidės, kurių kiekvienoje yra po *bla*_{OXA-24/40-šeima} geną (Grosso ir kt., 2012). pAB120 yra pirmoji žinoma *A. baumannii* plazmidė, turinti dvi kopijas geno, koduojančio OXA-24/40 šeimos karbapenemazę (OXA-72) (Povilonis ir kt., 2013). Tiesa, papildomais tyrimais nustatėme, kad pAB120 plazmidę turinčių *A. baumannii* *bla*_{OXA-72} genų raiška nebuvo didesnė už vieną *bla*_{OXA-24/40-šeima} kopiją turinčios *A. baumannii* (duomenys neparodyti).

OXA-72 karbapenemazes koduojantys genai nėra dažni *Acinetobacter* genties bakterijų plazmidėse. Tik retais atvejais nustatytos įvairaus dydžio plazmidės, turinčios *bla*_{OXA-72} geną, tačiau detalesnė šių plazmidžių struktūra nėra žinoma (Fernández-Cuenca ir kt., 2012; Montealegre ir kt., 2012; Lu ir kt., 2009; Werneck ir kt., 2011). Kai kuriose Pietų Europos šalyse užfiksuoti OXA-72 gaminančių *A. baumannii* protrūkiai, tačiau nėra duomenų apie šiose padermėse esančių *bla*_{OXA-72} genetinę lokalizaciją (Barnaud ir kt., 2010; Di Popolo ir kt., 2011; Goic-Barisic ir kt., 2011).

*bla*_{OXA-72} genus turinčios plazmidės pAB120 replikono sritis (*rep* genai, *oriV*, iteronai) beveik 100 % identiška GR2 plazmidžių pAB0057, p2ABAYE, p1TCDC0715, kurios neturi jokių CHDL koduojančių genų, analogiškoms sritims (Povilonis ir kt., 2013). Šiose plazmidėse tarp atitinkamų XerC/XerD sekų yra įterpti su atsparumu antibiotikams nesusiję DNR

fragmentai. Pažymėtina, kad pAB120 plazmidėje už replikono srities esančių XerC/XerD taikinių pozicijos atitinka esančias plazmidėse pAB0057 ir p1TCDC0715. Be to, atkreipėme dėmesį, kad ligoninėse, kuriose nustatytos pAB120 plazmidę turinčios *A. baumannii* padermės, taip pat vyravo kita padermių grupė, turinti plazmidės, kurių dydžiai, replikono grupė ir restrikcijos profiliai atitiko plazmidės pAB0057 ir p1TCDC0715. Šie pastebėjimai leidžia manyti, kad galbūt egzistuoja *repAci1/repAci2* tipo plazmidžių pirmtakas, o jame esančios XerC/XerD atpažinimo sekos tarnauja kaip taikiniai XerC/XerD rekombinazių vykdomai genetinei rekombinacijai. Tikėtina, kad dėl rekombinacijos yra pertvarkomos ir gali būti formuojamos skirtingų genetinių struktūrų plazmidės. Antros pAB120 *bla*_{OXA-72} geno kopijos genetinė aplinka beveik identiška plazmidžių pABVA01 ir pMMCU3 sričiai, turinčiai geną *bla*_{OXA-24/40} (Povilonis ir kt., 2013). Šis faktas sustiprina prielaidą, kad *Acinetobacter* genties bakterijose plazmidžių genetinė pertvarka gali vykti rekombinuojant sąlyginai dideliais DNR fragmentais, apribotais XerC/XerD atpažinimo sekomis. Įdomu ir tai, kad pAB120 plazmidėje esantys genai *gp49* ir *cro* (koduoja funkcionalią TA sistemą, Jurėnaitė ir kt., 2013) taip pat yra apsupti XerC/XerD atpažinimo sekomis. Šiam plazmidės fragmentui artimiausia sritis, apribota XerC/XerD sekų (90 % nukleotidų sekos tapatumas), yra būdinga *A. baumannii* ir *Acinetobacter venetianus* plazmidėms pAB1 ir pAV2 (Povilonis ir kt., 2013). Tai suteikia pagrindą manyti, kad dėl XerC/XerD rekombinacijos *Acinetobacter* spp. plazmidės gali keistis ne tik CHDL koduojančiais genais, bet ir kitais, pvz., plazmidžių išsilaikymui svarbiais elementais. Atsižvelgus į palyginamąją pAB120 ir kitų *Acinetobacter* spp. plazmidžių nukleotidų sekų analizę, taip pat į XerC/XerD taikinių gausą, spėjame, kad dvi CHDL koduojančių genų kopijas turinčios plazmidės pAB120 genetinė struktūra, susiformavo dėl kelių XerC/XerD rekombinacijos įvykių.

XerC/XerD rekombinacijos sistema nėra vienintelis sričiai savitos rekombinacijos mechanizmas, kuriuo *Acinetobacter* spp. plazmidės galėtų įgyti CHDL koduojančių genų. Kiek anksčiau kai kuriose *repAci1/repAci2*

plazmidėse nustatyti *bla*_{OXA-58} (koduoja karbapenemazes) genai, apsupti Re27 sekų (Poirel ir Nordmann, 2006; Bertini ir kt., 2007; Zarrilli ir kt., 2008). Re27 ir XerC/XerD atpažinimo sekos pasižymi dideliu nukleotidų sekų panašumu. Tai sustiprina hipotezę apie sričiai savitos rekombinacijos vaidmenį bakterijoms įgyjant CHDL koduojančius genus. Manoma, kad Re27 (arba XerC/XerD) taikiniai *repAci1/repAci2* tipo plazmidėse gali padidinti tikimybę, kad į jas bus įterpti CHDL koduojantys genai (Towner ir kt., 2011).

Plazmidė pAB120 neturėjo elementų, susijusių su plazmidės konjugacija ar mobilizacija. Manoma, kad dauguma žinomų *Acinetobacter* spp. plazmidžių greičiausiai yra nepernešamos, nes jos dažniausiai neturi su pernaša susijusių genų (Bertini ir kt., 2010). Išimtis būtų GR6 (*repAci6*) tipo 60–70 kb plazmidės, kuriose nustatyti konjugacijai būtini *tra* genai (Bertini ir kt., 2010). Manoma, kad šios plazmidės gali mobilizuoti kitas, CHDL genus turinčias plazmides (Bertini ir kt., 2010; Towner ir kt., 2011). GR6 (*repAci6*) tipo replikonas buvo reikšmingai dažniau ($p < 0,01$) paplitęs karbapenemams jautriose *Klasterio 1* (ECI klonas) padermėse, nei karbapenemams atspariose *Klasterio 2* padermėse, turinčioms plazmidę pAB120. Todėl labiausiai tikėtina, kad plazmidėse esančių *bla*_{OXA-72} genų išplitimą *A. baumannii* Lietuvos ligoninėse greičiausiai nulėmė ne plazmidžių horizontalioji pernaša, bet *A. baumannii* klonų išplitimas.

Sėkmingas plazmidės pAB120 perdavimas ir ilgalaikis CHDL genų išsilaikymas bakterijų populiacijoje, tikėtina, susijęs su dviem spėjamomis toksino-antitoksino sistemomis, kurių toksiną ir antitoksina koduojantys elementai nustatyti pAB120. Atvirų skaitymo rėmelių, koduojančių į Gp49 ir Cro panašius baltymus, sekos homologiškos genams, koduojantiems baltymus, priskiriamus atitinkamai RelE toksino ir Xre/Cro antitoksino šeimoms (Makarova ir kt., 2009). ORF5 ir ORF4 atviri skaitymo rėmeliai atitinkamai koduoja hipotetinius plazminės membranos ir citozolio baltymus, priklausančius DUF497 ir COG3514 baltymų šeimoms. Bioinformatine analize parodyta, kad šie baltymai struktūriškai gali būti panašūs į RelBE šeimai priskiriamas TA sistemas (Makarova ir kt., 2009). Jurėnaitės ir kt. tyrimai

parodė, kad abi sistemos veikia kaip toksino-antitoksino moduliai (Jurėnaitė ir kt., 2013). Įvertinti TA sistemų reikšmę plazmidės pAB120 išlaikymui *A. baumannii* populiacijoje reikia tolesnių tyrimų.

Apibendrinant galima teigti, kad šalies ligoninėse cirkuliuoja dvi didelės *A. baumannii* klonų grupės, priklausančios pasaulyje plačiai paplitusiems ECI ir ECII klonams. Šios klonų grupės tarpusavyje skiriasi tiek fenotipiniu atsparumu antibiotikams, tiek su juo susijusiais genų ir plazmidžių rinkiniais. Spartus atsparumo karbapenemams plitimas šalies ligoninėse, manome, susijęs su GR2 plazmidėje pAB120 esančiais karbapenemazes koduojančiais *bla*_{OXA-72} genais (Povilonis ir kt., 2013). Tikėtina, kad šių genų mobilizavimui ir pačių plazmidžių genetinei pertvarkai yra svarbi XerC/XerD rekombinacijos sistema.

IŠVADOS

1. Integronų paplitimo dažnis ir genų, lemiančių atsparumą antibiotikams, įvairovė rodo DAA fenotipo išplitimo mastą Lietuvoje išskirtose klinikinės ir gyvūninės kilmės Gram neigiamose bakterijose ir liudija apie atsaką gydymui vartojamiems aminoglikozidų, sulfonamidų/trimetoprimo, β -laktamų, makrolidų klasių antibiotikams;
2. Bendros genų kasetės klinikinės ir gyvūninės kilmės *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų integronuose bei jų pernaša liudija, kad atsparumą antibiotikams lemiančios genetinės determinantės per zoonotinius mikroorganizmus gali būti pernešamos iš gyvūnų į žmogaus organizmą;
3. Lietuvos ligoninėse cirkuliuoja *A. baumannii* pandeminių klonų linijos ECI ir ECII, kurioms būdingi skirtingi plazmidžių replikonų tipai ir jų deriniai. DAA fenotipu pasižyminčiose *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose vyrauja plačiai pasaulyje paplitusios su atsparumu antibiotikais susijusios IncF tipo plazmidės;
4. Šalies ligoninėse cirkuliuojančių *A. baumannii* atsparumą karbapenemams daugiausia lėmė nauja plazmidė pAB120, turinti karbapenemazės OXA-72 genus;
5. Plazmidės pAB120 genetinė struktūra liudija, kad XerC/XerD rekombinacijos sistema gali būti svarbi *A. baumannii* įgyjant *bla*_{OXA-24/40-šeima} karbapenemazių genus ir vykstant plazmidžių pertvarkai.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

- **Povilonis J**, Šeputienė V, Ružauskas M, Šiugždinienė R, Virgailis M, Pavilonis A, Sužiedėlienė E (2010). Transferable class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Foodborne Pathog Dis.* 7(10):1185-92.
- Šeputienė V, **Povilonis J**, Ružauskas M, Pavilonis A, Sužiedėlienė E (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *J Med Microbiol.* 59(Pt 3):315-22.
- **Povilonis J**, Šeputienė V, Krasauskas R, Juškaitė R, Miškinytė M, Sužiedėlis K, Sužiedėlienė E (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 68(5):1000-6.

Konferencijų tezės

- **J. Povilonis**, A. Bogdaitė, V. Šeputienė, R. Plančiūnienė, A. Pavilonis, E. Sužiedėlienė. Identification of a new integron-encoded OXA-type β -lactamase, OXA-205, in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. 22th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Londonas, Didžioji Britanija, 2012 03 31 – 04 03.
- V. Šeputienė, **J. Povilonis**, A. Bogdaitė, R. Juškaitė, M. Miškinytė, E. Sužiedėlienė. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Lithuanian hospitals. 22th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Londonas, Didžioji Britanija, 2012 03 31 – 04 03.
- **J. Povilonis**, V. Šeputienė, A. Vitkauskienė, E. Sužiedėlienė. Molecular typing of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care university hospital in Lithuania. 21th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/27th International Congress of Chemotherapy*. Milan, Italija, 2011 05 07 – 10.
- V. Šeputienė, A. Bogdaitė, **J. Povilonis**, R. Juškaitė, A. Vitkauskienė, E. Sužiedėlienė. OXA-carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* in tertiary care university hospital in Lithuania. 21th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/27th International Congress of Chemotherapy*. Milan, Italija, 2011 05 07 – 10.
- **J. Povilonis**, V. Šeputienė, M. Ružauskas, R. Šiugždinienė, A. Pavilonis, E. Sužiedėlienė. Prevalence of class 1 and class 2 integrons among *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. 19th *European Congress*

of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinkis, Suomija, 2009 05 16 – 19.

- **Žodinis pranešimas** „Atsparių antibiotikams *Acinetobacter baumannii* padermių, išskirtų 2010 m. Kauno klinikose, molekulinė epidemiologija“. IV-oji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Kaunas, 2011 04 07.
- **Žodinis pranešimas** „Dauginis atsparumas antibiotikams: I ir II klasės integronai Lietuvoje paplitusiose patogeniškosiose *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ir *Shigella* spp. padermėse“ konferencijoje „Mikroorganizmų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms: klinikiniai aspektai“. Panevėžys, 2008 11 26.

PADĖKA

Noriu padėkoti darbo vadovei prof. Editai Sužiedėlienei už nuoseklų vadovavimą, patarimus, vertingas pastabas ir savarankiško darbo įgūdžius. Už pirmąsias laboratorinio darbo pamokas esu labai dėkingas dr. Vaidai Šeputienei, kurios patarimai lydėjo ir viso šio darbo metu.

Norėčiau padėkoti visiems 120 laboratorijos kolektyvo buvusiems ir esantiems žmonėms už visokeriopą pagalbą per visus čia praleistus metus, o ypač – Julijui, Dukui, Renatui, Jūratei, Aurelijai, Ramintai.

Ačiū dr. Donaldui Čitavičiui ir dr. Nomedai Kuisienei, maloniai leidusiems naudotis PFGE įranga.

Dėkoju Mariui Linkevičiui už daugybę parūpintų straipsnių.

Už gerą nuotaiką, įdomius pokalbius ir diskusijas visada atsiminsiu dr. Arvydą Markucką.

Ačiū visiems Biochemijos ir molekulinės biologijos katedros darbuotojams už pagalbą ir geranoriškumą.

Labai dėkoju savo tėvams ir broliui už supratingumą, visokeriopą paramą visų studijų metu.

Ačiū draugams už palaikymą bei gerai praleistą laisvalaikį studijų metu.

Ypač dėkoju savo mylimai žmonai Simonai, be kurios patarimų ir pagalbos šis darbas nebūtų baigtas. Savo sūnui Kristupui Emiliui – už įkvėpimą „sunkiausiomis minutėmis“.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abbott, Y., O'Mahony, R., Leonard, N., Quinn, P.J., van der Reijden, T., Dijkshoorn, L., and Fanning, S. (2005). Characterization of a 2.6 kbp variable region within a class 1 integron found in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated from a horse. *J. Antimicrob. Chemother.* *55*, 367–370.
2. Ahmed, A.M., Nakano, H., and Shimamoto, T. (2005). Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* *55*, 371–374.
3. Ajiboye, R.M., Solberg, O.D., Lee, B.M., Raphael, E., Debroy, C., and Riley, L.W. (2009). Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* *49*, 365–371.
4. Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* *11*, 2970–2988.
5. Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* *2*, 158.
6. Aminov, R.I., and Mackie, R.I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* *271*, 147–161.
7. Angulo, F.J., Nunnery, J.A., and Bair, H.D. (2004). Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Rev. – Off. Int. Epizoot.* *23*, 485–496.
8. Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., and Peixe, L. (2004). Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* *54*, 429–434.
9. Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., and Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1612–1615.

10. Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Pages, J.M., and Nordmann, P. (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 1615–1620.
11. Baraniak, A., Fiett, J., Sulikowska, A., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M. (2002). Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 151–159.
12. Barlow, M., and Hall, B.G. (2002). Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J. Mol. Evol.* *55*, 314–321.
13. Barlow, R.S., and Gobius, K.S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* *58*, 1133–1138.
14. Barnaud, G., Zihoune, N., Ricard, J.D., Hippeaux, M.C., Eveillard, M., Dreyfuss, D., and Branger, C. (2010). Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *J. Hosp. Infect.* *76*, 358–360.
15. Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* *153 Suppl 1*, S347–357.
16. Berçot, B., Poirel, L., and Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 4526–4527.
17. Bertini, A., Poirel, L., Bernabeu, S., Fortini, D., Villa, L., Nordmann, P., and Carattoli, A. (2007). Multicopy *blaOXA-58* gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2324–2328.
18. Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P.D., Villa, L., Nordmann, P., and Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 4168–4177.

19. Birnbaum, J., Kahan, F.M., Kropp, H., and MacDonald, J.S. (1985). Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.* *78*, 3–21.
20. Blahna, M.T., Zalewski, C.A., Reuer, J., Kahlmeter, G., Foxman, B., and Marrs, C.F. (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* *57*, 666–672.
21. Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., and Mulvey, M.R. (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* *183*, 5725–5732.
22. Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., and Stokes, H.W. (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* *15*, 301–309.
23. Bouvier, M., Demarre, G., and Mazel, D. (2005). Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* *24*, 4356–4367.
24. Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 933–951, table of contents.
25. Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 969–976.
26. Cabrera, R., Marco, F., Vila, J., Ruiz, J., and Gascón, J. (2006). Class 1 Integrons in *Salmonella* Strains causing traveler's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1612–1613.
27. Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., and Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 1607–1615.
28. Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.* *44*, 141–166.

29. Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 2227–2238.
30. Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int. J. Med. Microbiol.* *301*, 654–658.
31. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* *63*, 219–228.
32. Carnoy, C., and Roten, C.-A. (2009). The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS ONE* *4*, e6531.
33. Castanheira, M., Sader, H.S., and Jones, R.N. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb. Drug Resist.* *16*, 61–65.
34. Cattoir, V., and Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr. Med. Chem.* *16*, 1028–1046.
35. Chen, C.-Y., Wu, K.-M., Chang, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, H.-C., Liao, T.-L., Liu, Y.-M., Chen, H.-J., Shen, A.B.-T., Li, J.-C., et al. (2003). Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* *13*, 2577–2587.
36. Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., and Meng, J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 1–7.
37. Cholley, P., Hocquet, D., Alauzet, C., Cravoisy-Popovic, A., Talon, D., Aissa, N., Plésiat, P., and Bertrand, X. (2010). Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. *J. Med. Microbiol.* *59*, 866–869.
38. Chopade, B.A., Wise, P.J., and Towner, K.J. (1985). Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J. Gen. Microbiol.* *131*, 2805–2811.

39. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Eighth Edition: Approved Standard M07-A8. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
40. Cloeckaert, A., Praud, K., Doublet, B., Bertini, A., Carattoli, A., Butaye, P., Imberechts, H., Bertrand, S., Collard, J.-M., Arlet, G., et al. (2007). Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*TEM-52 gene-carrying IncII plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 1872–1875.
41. Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., and Piffaretti, J.-C. (2007). Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *50*, 126–132.
42. Collis, C.M., and Hall, R.M. (1992). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* *174*, 1574–1585.
43. Collis, C.M., and Hall, R.M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 155–162.
44. Collis, C.M., Kim, M.J., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1998). Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol. Microbiol.* *29*, 477–490.
45. Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (2002). Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* *46*, 1415–1427.
46. Collis, C.M., Recchia, G.D., Kim, M.J., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (2001). Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J. Bacteriol.* *183*, 2535–2542.
47. Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., and Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infect. Dis.* *14*, 195–200.

48. Crowley, D., Daly, M., Lucey, B., Shine, P., Collins, J.J., Cryan, B., Moore, J.E., Murphy, P., Buckley, G., and Fanning, S. (2002). Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *J. Appl. Microbiol.* 92, 992–1004.
49. D'Andrea, M.M., Giani, T., D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Luzzaro, F., and Rossolini, G.M. (2009). Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3528–3533.
50. D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Ballardini, M., Bartolini, S., Bordi, E., Di Stefano, A., Galiè, M., Minniti, R., et al. (2009). Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 347–357.
51. Daly, M., and Fanning, S. (2000). Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4842–4848.
52. Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375–382.
53. DeNap, J.C.B., and Hergenrother, P.J. (2005). Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org. Biomol. Chem.* 3, 959–966.
54. Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., and Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 79–114.
55. Dijkshoorn, L., Nemec, A., and Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 939–951.
56. Dolejská, M., Senk, D., Cízek, A., Rybaríková, J., Sychra, O., and Literák, I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res. Vet. Sci.* 85, 491–494.

57. Drawz, S.M., and Bonomo, R.A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201.
58. Drouin, F., Mélançon, J., and Roy, P.H. (2002). The IntI-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. *J. Bacteriol.* 184, 1811–1815.
59. Dubois, V., Arpin, C., Quentin, C., Texier-Maugein, J., Poirel, L., and Nordmann, P. (2003). Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid- and integron-encoded OXA-30 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2380–2381.
60. van Duijn, P.J., Dautzenberg, M.J.D., and Oostdijk, E.A.N. (2011). Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care* 17, 658–665.
61. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.
62. El Garch, F., Bogaerts, P., Bebrone, C., Galleni, M., and Glupczynski, Y. (2011). OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4828–4833.
63. van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K., and Mevius, D. (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 746–750.
64. Fernández-Cuenca, F., Rodríguez-Martínez, J.M., Gómez-Sánchez, M.A.C., de Alba, P.D., Infante-Martínez, V., and Pascual, A. (2012). Production of a plasmid-encoded OXA-72 β -lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 93–94.
65. Fiett, J., Baraniak, A., Mrówka, A., Fleischer, M., Drulis-Kawa, Z., Naumiuk, Ł., Samet, A., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M. (2006).

Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 880–886.

66. Fluit, A.C., and Schmitz, F.J. (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 761–770.

67. Fluit, A.C., and Schmitz, F.-J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* *10*, 272–288.

68. Fondi, M., Bacci, G., Brillì, M., Papaleo, M.C., Mengoni, A., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., and Fani, R. (2010). Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol. Biol.* *10*, 59.

69. Frost, L.S., and Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol* *5*, 1057–1071.

70. Fursova, N.K., Pryamchuk, S.D., Abaev, I.V., Kovalev, Y.N., Shishkova, N.A., Pecherskikh, E.I., Korobova, O.V., Astashkin, E.I., Pachkunov, D.M., Svetoch, E.A., et al. (2010). [Genetic environments of bla(CTX-M) genes located on conjugative plasmids of *Enterobacteriaceae* nosocomial isolates collected in Russia within 2003-2007]. *Antibiot. Khimioter.* *55*, 3–10.

71. Gassama, A., Aïdara-Kane, A., Chainier, D., Denis, F., and Ploy, M.-C. (2004). Integron-associated antibiotic resistance in enteroaggregative and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* *10*, 27–30.

72. Getchell-White, S.I., Donowitz, L.G., and Gröschel, D.H. (1989). The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* *10*, 402–407.

73. Giamarellou, H. (2010). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int. J. Antimicrob. Agents* *36 Suppl 2*, S50–54.

74. Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., and Stokes, H.W. (2008). The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* *190*, 5095–5100.

75. Giordano, A., Varesi, P., Bertini, A., Villa, L., Dionisi, A.M., Venditti, M., Carfagna, P., Luzzi, I., Mancini, C., and Carattoli, A. (2007). Outbreak of

Acinetobacter baumannii producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb. Drug Resist.* *13*, 37–43.

76. Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M.-F., Bertini, A., and Nordmann, P. (2007). Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 4681–4685.

77. Giuliani, F., Docquier, J.-D., Riccio, M.L., Pagani, L., and Rossolini, G.M. (2005). OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 1973–1980.

78. Goic-Barisic, I., Towner, K.J., Kovacic, A., Sisko-Kraljevic, K., Tonkic, M., Novak, A., and Punda-Polic, V. (2011). Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J. Hosp. Infect.* *77*, 368–369.

79. Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G., et al. (2001). Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 723–726.

80. Gombac, F., Riccio, M.L., Rossolini, G.M., Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Lavenia, A., and 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 3665–3668.

81. Gordon, N.C., and Wareham, D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* *35*, 219–226.

82. Gravel, A., Fournier, B., and Roy, P.H. (1998). DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the attI1 site. *Nucleic Acids Res.* *26*, 4347–4355.

83. Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., and Rice, P.A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 567–605.

84. Grosso, F., Quinteira, S., Poirel, L., Novais, Â., and Peixe, L. (2012). Role of common blaOXA-24/OXA-40-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3969–3972.
85. Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
86. Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., and Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 489–492.
87. Gupta, N., Limbago, B.M., Patel, J.B., and Kallen, A.J. (2011). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 53, 60–67.
88. Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496–1499.
89. Hall, R.M., and Stokes, H.W. (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90, 115–132.
90. Hamano, Y., Matsuura, N., Kitamura, M., and Takagi, H. (2006). A novel enzyme conferring streptothricin resistance alters the toxicity of streptothricin D from broad-spectrum to bacteria-specific. *J. Biol. Chem.* 281, 16842–16848.
91. Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., and Collatz, E. (2002). An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol. Microbiol.* 44, 119–130.
92. Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., and Roy, P.H. (2002). IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 184, 1712–1721.
93. Heir, E., Lindstedt, B.-A., Leegaard, T.M., Gjernes, E., and 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. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3, 12.

94. Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., and Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 233–238.
95. Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., and Waldor, M.K. (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2991–3000.
96. Hocquet, D., Colomb, M., Dehecq, B., Belmonte, O., Courvalin, P., Plésiat, P., and Meziane-Cherif, D. (2011). Ceftazidime-hydrolysing β -lactamase OXA-145 with impaired hydrolysis of penicillins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 1745–1750.
97. van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., and Aarts, H.J.M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* *2*, 203.
98. Holloway, B.W. (1969). Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev* *33*, 419–443.
99. Hooper, D.C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* *32 Suppl 1*, S9–S15.
100. Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., and Walsh, T.R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 5046–5054.
101. Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., Tae, S.H., Choi, C.H., Lee, E.Y., Seol, S.Y., et al. (2003). Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 5429–5433.
102. Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* *41 Suppl 2*, S120–126.

- 103.** Jacquier, H., Zaoui, C., Sanson-le Pors, M.-J., Mazel, D., and Berçot, B. (2009). Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Mol. Microbiol.* *72*, 1475–1486.
- 104.** Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., and Hawkey, P.M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 1938–1941.
- 105.** Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., and Sundström, L. (2004). Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4033–4043.
- 106.** Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Johnson, S.J., Logue, C.M., White, D.G., Doetkott, C., and Nolan, L.K. (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 1976–1983.
- 107.** Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., and Ploy, M.-C. (2010). Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet.* *6*, e1000793.
- 108.** Juan, C., Mulet, X., Zamorano, L., Albertí, S., Pérez, J.L., and Oliver, A. (2009). Detection of the novel extended-spectrum beta-lactamase OXA-161 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 5288–5290.
- 109.** Jurėnaitė, M., Markuckas, A., and Sužiedėlienė, E. (2013). Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* *JB. 00237-13*; epub ahead of print 10 May 2013.
- 110.** Kadlec, K., and Schwarz, S. (2008). Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 469–473.
- 111.** Karah, N., Giske, C.G., Sundsfjord, A., and Samuelsen, Ø. (2011). A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. *Microb. Drug. Resist.* *17*, 545-549.

- 112.** Kempf, M., and Rolain, J.-M. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* *39*, 105–114.
- 113.** Koenig, J.E., Boucher, Y., Charlebois, R.L., Nesbø, C., Zhaxybayeva, O., Bapteste, E., Spencer, M., Joss, M.J., Stokes, H.W., and Doolittle, W.F. (2008). Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments. *Environ. Microbiol.* *10*, 1024–1038.
- 114.** Kovács, A.T., Smits, W.K., Mirończuk, A.M., and Kuipers, O.P. (2009). Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environ. Microbiol.* *11*, 1911–1922.
- 115.** Kraniotaki, E., Manganelli, R., Platsouka, E., Grossato, A., Paniara, O., and Palù, G. (2006). Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons. *Int. J. Antimicrob. Agents* *28*, 193–199.
- 116.** Krauland, M.G., Marsh, J.W., Paterson, D.L., and Harrison, L.H. (2009). Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerging Infect. Dis.* *15*, 388–396.
- 117.** Labbate, M., Case, R.J., and Stokes, H.W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* *532*, 103–125.
- 118.** Landers, T.F., Cohen, B., Wittum, T.E., Larson, E.L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* *127*(1):4-22.
- 119.** Lanz, R., Kuhnert, P., and Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* *91*, 73–84.
- 120.** Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* *68*, 118–130.

121. Lee, K., Yong, D., Jeong, S.H., and Chong, Y. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med. J.* 52, 879–891.
122. Léon, G., and Roy, P.H. (2003). Excision and integration of cassettes by an integron integrase of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 185, 2036–2041.
123. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., and Roy, P.H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 185–191.
124. Libisch, B., Balogh, B., and Füzi, M. (2009). Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a countrywide distribution in Hungary. *Curr. Microbiol.* 58, 111–116.
125. Liebert, C.A., Hall, R.M., and Summers, A.O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 507–522.
126. Lin, J.S., and Tsen, H.Y. (1999). Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella Typhimurium* in stool and food samples. *J. Food Prot.* 62, 1103–1110.
127. Lindstedt, B.-A., Heir, E., Nygård, I., and Kapperud, G. (2003). Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J. Med. Microbiol.* 52, 141–149.
128. Liu, W., Liu, X., Liao, J., Zhang, Y., and Liang, X. (2010). Identification of blaOXA-128 and blaOXA-129, two novel OXA-type extended-spectrum- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, in Hunan Province, China. *J. Basic Microbiol.* 50 Suppl 1, S116–119.
129. Livermore, D.M. (2012). Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 283–294.
130. Livermore, D.M. (2009). Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob Chemother.* 64 Suppl1:i29-36.
131. Livermore, D.M., and Woodford, N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 489–495.
132. Lu, P.-L., Doumith, M., Livermore, D.M., Chen, T.-P., and Woodford, N. (2009). Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter*

baumannii from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 641–647.

133. MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., and Gopaul, D.N. (2006). Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* *440*, 1157–1162.

134. Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., and Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 296–302.

135. Magnet, S., and Blanchard, J.S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* *105*, 477–498.

136. Magnet, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 3375–3380.

137. Majtánová, L., Majtán, T., and Majtán, V. (2007). Molecular characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella typhimurium* isolated in Slovakia. *Pol. J. Microbiol.* *56*, 19–23.

138. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol. Direct* *4*, 19.

139. Maragakis, L.L., and Perl, T.M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* *46*, 1254–1263.

140. Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., and Arlet, G. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 67–71.

141. Márquez, C., Labbate, M., Ingold, A.J., Roy Chowdhury, P., Ramírez, M.S., Centrón, D., Borthagaray, G., and Stokes, H.W. (2008). Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 4153–4154.

142. Mathew, A.G., Cissell, R., and Liamthong, S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 115–133.
143. Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620.
144. Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280, 605–608.
145. Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1568–1574.
146. McDermott, P.F., Walker, R.D., and White, D.G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int. J. Toxicol.* 22, 135–143.
147. Meng, H., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Li, L., Miyoshi, S.-I., Yan, H., and Shi, L. (2011). Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Salmonella* strains isolated from food products of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 274–277.
148. Merino, M., Acosta, J., Poza, M., Sanz, F., Beceiro, A., Chaves, F., and Bou, G. (2010). OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2724–2727.
149. Messier, N., and Roy, P.H. (2001). Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J. Bacteriol.* 183, 6699–6706.
150. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., and Helmuth, R. (2003). Multiple-drug resistance in D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3640–3643.
151. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., and Helmuth, R. (2005). Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1025–1033.

- 152.** Mitsuhashi, S., Harada, K., Hashimoto, H., and Egawa, R. (1961). On the drug-resistance of enteric bacteria. 4. Drug-resistance of *Shigella* prevalent in Japan. *Jpn. J. Exp. Med.* *31*, 47–52.
- 153.** Montealegre, M.C., Maya, J.J., Correa, A., Espinal, P., Mojica, M.F., Ruiz, S.J., Rosso, F., Vila, J., Quinn, J.P., and Villegas, M.V. (2012). First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 3996–3998.
- 154.** Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., and Correia, A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* *60*, 1243–1250.
- 155.** Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* *8*, 1915–1922.
- 156.** Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* *183*, 235–249.
- 157.** Naas, T., Nordmann, P., Vedel, G., and Poyart, C. (2005). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 4423–4424.
- 158.** Navon-Venezia, S., Leavitt, A., and Carmeli, Y. (2007). High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 772–774.
- 159.** Nemeč, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., and Dijkshoorn, L. (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* *53*, 1233–1240.
- 160.** Nemeč, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vanechoutte, M., Brisse, S., and Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of

Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res. Microbiol. 162, 393–404.

161. Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends Mol Med 18, 263–272.

162. Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., and Livermore, D.M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol. 19, 588–595.

163. Nordström, K. (2006). Plasmid R1-replication and its control. Plasmid 55, 1–26.

164. Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. 51, 381–395.

165. Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., and Landy, A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. Nucleic Acids Res. 26, 391–406.

166. Osborn, A.M., and Böltner, D. (2002). When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. Plasmid 48, 202–212.

167. Ozgumus, O.B., Caylan, R., Tosun, I., Sandalli, C., Aydin, K., and Koksal, I. (2007). Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. Microb. Drug Resist. 13, 191–198.

168. Ozgumus, O.B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E., and Sivri, N. (2009). Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. J. Microbiol. 47, 19–27.

169. Pallecchi, L., Riccio, M.L., Docquier, J.D., Fontana, R., and Rossolini, G.M. (2001). Molecular heterogeneity of bla(VIM-2)-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo-beta-lactamase. FEMS Microbiol. Lett. 195, 145–150.

170. Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., and Hooper, D.C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6′)-Ib-cr encoding a

ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3953–3955.

171. Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., and Iredell, J.R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* *33*, 757–784.

172. Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 657–686.

173. Patzer, J.A., Walsh, T.R., Weeks, J., Dzierzanowska, D., and Toleman, M.A. (2009). Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 269–273.

174. Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 538–582.

175. Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., and Bonomo, R.A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 3471–3484.

176. Périchon, B., Courvalin, P., and Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2464–2469.

177. Perreten, V., and Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 1169–1172.

178. Peters, E.D., Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T., Verhoef, J., and Fluit, A.C. (2001). Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2961–2964.

179. Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* *300*, 371–379.

180. Poehlsgaard, J., and Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 870–881.

- 181.** Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., and Nordmann, P. (2010a). A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1594–1598.
- 182.** Poirel, L., Figueiredo, S., Cattoir, V., Carattoli, A., and Nordmann, P. (2008). *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1252–1256.
- 183.** Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010b). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 24–38.
- 184.** Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1442–1448.
- 185.** Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., and Zarrilli, R. (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 197–201.
- 186.** Potron, A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2011). Plasmid-mediated transfer of the bla(NDM-1) gene in Gram-negative rods. *FEMS Microbiol. Lett.* *324*, 111–116.
- 187.** Pournaras, S., Maniati, M., Petinaki, E., Tzouvelekis, L.S., Tsakris, A., Legakis, N.J., and Maniatis, A.N. (2003). Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J. Antimicrob. Chemother.* *51*, 1409–1414.
- 188.** Povilonis, J., Šeputienė, V., Ružauskas, M., Šiugždinienė, R., Virgailis, M., Pavilonis, A., and Sužiedėlienė, E. (2010). Transferable class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Foodborne. Pathog. Dis.* *7*, 1185–1192.
- 189.** Povilonis, J., Šeputienė, V., Krasauskas, R., Juškaitė, R., Miškinytė, M., Sužiedėlis, K., and Sužiedėlienė, E. (2013). Spread of carbapenem-resistant

Acinetobacter baumannii carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(5):1000-6.

190. Prescott, J.F. (2008). Antimicrobial use in food and companion animals. *Anim Health Res Rev* 9, 127–133.

191. Pritchett, L.C., Konkell, M.E., Gay, J.M., and Besser, T.E. (2000). Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3484–3488.

192. Queenan, A.M., and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440–458, table of contents.

193. Ramírez, M.S., Morales, A., Vilacoba, E., Márquez, C., and Centrón, D. (2012). Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) clones of *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Microbiol.* 64, 290–293.

194. Ramírez, M.S., Piñeiro, S., and Centrón, D. (2010). Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 699–706.

195. Ramirez, M.S., and Tolmasky, M.E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13, 151–171.

196. Rasmussen, M.A., Carlson, S.A., Franklin, S.K., McCuddin, Z.P., Wu, M.T., and Sharma, V.K. (2005). Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity of and invasion by multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* bearing SGI1. *Infect. Immun.* 73, 4668–4675.

197. Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, C.J., Summers, A.O., Tsuda, M., et al. (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167–173.

198. Roberts, M.C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol. Biotechnol.* 20, 261–283.

199. Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 195–203.

- 200.** Rossolini, G.M., and Mantengoli, E. (2008). Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* *14*, Suppl 6:2-8.
- 201.** Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* *43*, 1657–1669.
- 202.** Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., and Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 652–657.
- 203.** Rowe-Magnus, D.A., and Mazel, D. (2001). Integrations: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 565–569.
- 204.** Rowe-Magnus, D.A., and Mazel, D. (2002). The role of integrations in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* *292*, 115–125.
- 205.** Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* *132*, 365–386.
- 206.** Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* *51*, 1109–1117.
- 207.** Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J.P., and Viñas, M. (2011). Class 1 integrations in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* *38*, 398–402.
- 208.** Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., and Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 3084–3090.
- 209.** Sabtcheva, S., Saga, T., Kantardjiev, T., Ivanova, M., Ishii, Y., and Kaku, M. (2008). Nosocomial spread of armA-mediated high-level aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-3 beta-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. *J Chemother* *20*, 593–599.

- 210.** Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, published by Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 211.** Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A., and Gómez-Duarte, O.G. (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* 9, 263–277.
- 212.** Sandalli, C., Buruk, C.K., Sancaktar, M., and Ozgumus, O.B. (2010). Prevalence of integrons and a new *dfrA17* variant in Gram-negative bacilli which cause community-acquired infections. *Microbiol. Immunol.* 54, 164–169.
- 213.** Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., and Larsen, J.L. (2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5675–5682.
- 214.** Schuldiner, S., Granot, D., Mordoch, S.S., Ninio, S., Rotem, D., Soskin, M., Tate, C.G., and Yerushalmi, H. (2001). Small is mighty: *EmrE*, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *News Physiol. Sci.* 16, 130–134.
- 215.** Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542.
- 216.** Seifert, H., Schulze, A., Baginski, R., and Pulverer, G. (1994). Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 82–86.
- 217.** Šeputienė, V., Linkevičius, M., Bogdaitė, A., Povilonis, J., Planciūnienė, R., Giedraitienė, A., Pavilonis, A., and Sužiedėlienė, E. (2010a). Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Lithuania. *J. Med. Microbiol.* 59, 1263–1265.
- 218.** Šeputienė, V., Povilonis, J., Armalytė, J., Sužiedėlis, K., Pavilonis, A., and Sužiedėlienė, E. (2010b). Tigecycline – how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Medicina (Kaunas)* 46, 240–248.

- 219.** Šeputienė, V., Povilonis, J., Ružauskas, M., Pavilonis, A., and Sužiedėlienė, E. (2010c). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *J. Med. Microbiol.* *59*, 315–322.
- 220.** Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* *32*, 261–273.
- 221.** Slater, F.R., Bailey, M.J., Tett, A.J., and Turner, S.L. (2008). Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* *66*, 3–13.
- 222.** Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 434–452.
- 223.** Souli, M., Galani, I., and Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* *13*,.
- 224.** Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., and Ploy, M.-C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* *3*, 119.
- 225.** Stokes, H.W., and Gillings, M.R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* *35*, 790–819.
- 226.** Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* *3*, 1669–1683.
- 227.** Stokes, H.W., Tomaras, C., Parsons, Y., and Hall, R.M. (1993). The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* *30*, 39–50.
- 228.** Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 664–689.

- 229.** Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J.* *7*, 851–858.
- 230.** Sunde, M. (2005). Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J. Antimicrob. Chemother.* *56*, 1019–1024.
- 231.** Sunde, M., and Norström, M. (2006). The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* *58*, 741–747.
- 232.** Sundsfjord, A., Simonsen, G.S., Haldorsen, B.C., Haaheim, H., Hjelmevoll, S.-O., Littauer, P., and Dahl, K.H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* *112*, 815–837.
- 233.** Sunenshine, R.H., Wright, M.-O., Maragakis, L.L., Harris, A.D., Song, X., Hebden, J., Cosgrove, S.E., Anderson, A., Carnell, J., Jernigan, D.B., et al. (2007). Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerging Infect. Dis.* *13*, 97–103.
- 234.** Tavakoli, N., Comanducci, A., Dodd, H.M., Lett, M.C., Albiger, B., and Bennett, P. (2000). IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* *44*, 66–84.
- 235.** Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., and Schlüter, A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* *45*, 239–252.
- 236.** Thomas, C.M., and Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 711–721.
- 237.** Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673–4680.
- 238.** Tian, G.-B., Adams-Haduch, J.M., Bogdanovich, T., Pasculle, A.W., Quinn, J.P., Wang, H.-N., and Doi, Y. (2011). Identification of diverse OXA-

40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 429–432.

239. Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006a). Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* *58*, 1–6.

240. Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006b). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 296–316.

241. Towner, K.J., Evans, B., Villa, L., Levi, K., Hamouda, A., Amyes, S.G.B., and Carattoli, A. (2011). Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase genes in European clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 2154–2159.

242. Tripodi, M.-F., Durante-Mangoni, E., Fortunato, R., Utili, R., and Zarrilli, R. (2007). Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int. J. Antimicrob. Agents* *30*, 537–540.

243. Tsakris, A., Ikonomidis, A., Poulou, A., Spanakis, N., Vrizas, D., Diomidous, M., Pournaras, S., and Markou, F. (2008). Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin. Microbiol. Infect.* *14*, 588–594.

244. Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Coelho, J.M., Warner, M., Pike, R., and Pitt, T.L. (2005). Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 3074–3082.

245. Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., and Pitt, T.L. (2006). The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* *258*, 72–77.

- 246.** Turton, J.F., Gabriel, S.N., Walderrey, C., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* *13*, 807-815.
- 247.** Vaisvila, R., Morgan, R.D., Posfai, J., and Raleigh, E.A. (2001). Discovery and distribution of super-integrins among pseudomonads. *Mol. Microbiol.* *42*, 587–601.
- 248.** Vakulenko, S.B., and Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* *16*, 430–450.
- 249.** Varma, J.K., Greene, K.D., Ovitt, J., Barrett, T.J., Medalla, F., and Angulo, F.J. (2005). Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002. *Emerging Infect. Dis.* *11*, 943–946.
- 250.** Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Tzouvelekis, L., Tassios, P.T., Kosmidis, C., Petrikos, G., Roma, E.S., Charvalos, E., Passiotou, M., Avlami, A., et al. (2009). Prevalence and characterization of class 1 integrins in *Escherichia coli* of poultry and human origin. *Foodborne Pathog. Dis.* *6*, 1211–1218.
- 251.** Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M.A., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. (2008). Prevalence and diversity of integrins and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 934–937.
- 252.** Vo, A.T.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., and Gaastra, W. (2007). Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet. Microbiol.* *124*, 248–255.
- 253.** Vo, A.T.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Wannet, W.J.B., Verbruggen, A.J., Maas, H.M.E., and Gaastra, W. (2006). Antibiotic resistance, integrins and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int. J. Antimicrob. Agents* *28*, 172–179.
- 254.** Walsh, T.R. (2008). Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *21*, 367–371.

- 255.** Watanabe, T., and Fukasawa, T. (1961). Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bacteriol.* *81*, 669–678.
- 256.** Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., and Rüdén, H. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 1394–1397.
- 257.** Werneck, J.S., Picão, R.C., Carvalhaes, C.G., Cardoso, J.P., and Gales, A.C. (2011). OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 452–454.
- 258.** White, P.A., McIver, C.J., and Rawlinson, W.D. (2001). Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2658–2661.
- 259.** Willi, K., Sandmeier, H., Kulik, E.M., and Meyer, J. (1997). Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23. *Cell. Mol. Life Sci.* *53*, 904–910.
- 260.** Woodford, N., Turton, J.F., and Livermore, D.M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* *35*, 736–755.
- 261.** Wozniak, R.A.F., and Waldor, M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 552–563.
- 262.** Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 1451–1470.
- 263.** Wright, G.D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 589–594.
- 264.** Zarrilli, R., Crispino, M., Bagattini, M., Barretta, E., Di Popolo, A., Triassi, M., and Villari, P. (2004). Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 946–953.
- 265.** Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M., and Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular

epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 3, 335–341.

266. Zarrilli, R., Vitale, D., Di Popolo, A., Bagattini, M., Daoud, Z., Khan, A.U., Afif, C., and Triassi, M. (2008). A plasmid-borne blaOXA-58 gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4115–4120.